Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Die Adenylatzyklase der Magenschleimhaut: Inhibitorische Wirkung eines neuen Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonisten und Studien zur funktionellen Bedeutung.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Gladziwa
aus Bielefeld
1980

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Die Adenylatzyklase der Magenschleimhaut: Inhibitorische Wirkung eines neuen Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonisten und Studien zur funktionellen Bedeutung.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Gladziwa
aus Bielefeld
1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. Haselmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.-J. Ruoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. K.-Fr. Sewing

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Das "second messenger" Prinzip	1
1.2.	cAMP und Säuresekretion	4
1.3.	Histamin-H_2-Rezeptoren und Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonisten	5
1.4.	Durchgeführte Untersuchungen	8
2.	METHODIK	10
2.1.	Untersuchungsmaterial	10
2.2.	Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	11
2.3.	Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität	12
2.4.	cAMP-Bestimmung mit dem Gilman-Test	13
2.5.	Proteinbestimmung der Homogenate nach Lowry	14
2.6.	Auswertung der Versuche	15
2.7.	Verwendete Substanzen	16
2.8.	Lösungen	20
2.9.	Geräte	21
3.	ERGEBNISSE	22
3.1.	Untersuchungen zur Methodik des Adenylatzyklase-Tests	22
3.1.1.	Gewebehomogenisation	22
3.1.2.	Inkubationsdauer	26
3.1.3.	Proteinkonzentrat	27
3.1.4.	pH	27
3.1.5.	GTP	28
3.1.6.	Bedingungen für die Routinemessungen	30
3.2.	Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit von Cimetidin und Ranitidin (Magenschleimhaut des Meerschweinchens)	30
3.2.1.	Einfluß auf die Basalaktivität	30
3.2.2.	Einfluß auf die maximal histaminstimulierte Adenylatzyklase	33

		Seite
3.2.3.	Einfluß auf die Histamin-Konzentrations-wirkungskurve	33
3.2.3.1.	Einfluß von 10^{-6} mol/l Cimetidin und Ranitidin	34
3.2.3.2.	Einfluß von 10^{-4} mol/l Cimetidin und Ranitidin	36
3.2.4.	Einfluß auf die Histamin-Konzentrations-wirkungskurve bei höherer Pufferkapazität	37
3.3.	Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit von Cimetidin und Ranitidin (Magenschleimhaut des Menschen)	39
3.3.1.	Einfluß auf die maximal histaminstimulierte Adenylatzyklase	39
3.3.2.	Einfluß auf die Histamin-Konzentrations-wirkungskurve	41
3.3.3.	Vergleich von Cimetidin und Ranitidin	41
3.4.	Adenylatzyklase-Aktivität in Fundus-Biopsieproben von Magengesunden und Patienten mit Magen- oder Duodenalulcus ohne und unter Cimetidin-Behandlung	42
3.4.1.	Histamin	42
3.4.2.	Prostaglandin E_2	44
3.4.3.	Adrenalin	45
4.	DISKUSSION	47
4.1.	Untersuchungen zur Methodik	47
4.2.	Inhibitorische Wirksamkeit von Ranitidin und Cimetidin	51
4.3.	Adenylatzyklase in der Schleimhaut von Magengesunden und Patienten mit peptischem Ulcus	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG	60
6.	LITERATURVERZEICHNIS	62

1. EINLEITUNG

1.1. Das "second messenger" Prinzip

Nukleotide sind Verbindungen aus Purin- bzw. Pyrimidinbasen, Zucker und Phosphorsäure. Sie haben als Coenzyme regulatorische Funktionen bei Stoffwechselprozessen; ganz besonders gilt dies für die energiereichen Phosphate, wie etwa Adenosintriphosphat (ATP), das z. B. bei aktiven Transportvorgängen durch die Zellmembranen der entscheidende Energielieferant ist.

Im Jahre 1971 wurde der Nobelpreis für Medizin an E. W. Sutherland für die Erkennung des zyklischen 3', 5'-Adenosinmonophosphates (cAMP) als sogenannter "second messenger" verliehen. Sutherlands Konzept ist Ausgangspunkt für eine Fülle weiterer Untersuchungen geworden.

Das cAMP entsteht aus ATP unter Beteiligung einer Adenylatzyklase, deren Aktivität von der Anwesenheit von Magnesiumionen abhängig ist (Sutherland et al., 1962). "Zyklisch" ist diese Verbindung, weil, wie Abb. 1 zeigt, der nach Abspaltung von Pyrophosphat verbleibende Phosphatrest ringförmig über die 3'-Hydroxylgruppe an den Riboseteil gebunden ist. Sutherland hat auf Grund der Tatsache, daß verschiedene Hormone die Adenylatzyklase stimulieren, 1965 seine Theorie vom "second messenger" aufgestellt, die entsprechend Abb. 1 folgendes beinhaltet: Ein endokrines Organ setzt den "first messenger", eine hormonell wirkende Substanz, frei. Dieser Wirkstoff aktiviert über einen spezifischen Rezeptor die in der Zellmembran befindliche Adenylatzyklase. Dadurch wird in der Zelle cAMP gebildet, das nun seinerseits als "second messenger" intrazelluläre enzymatische Prozesse startet oder blockiert (Sutherland et al., 1965). Die Hormone, deren Wirkung

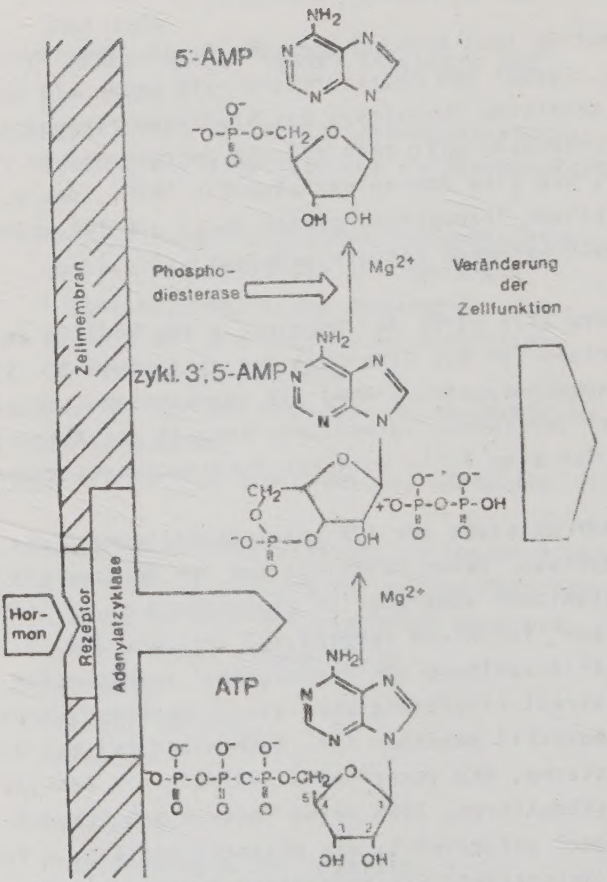


Abb. 1: Schematische Darstellung der hormonellen Aktivierung der Adenylatzyklase, der Bildung und des Metabolismus von zyklischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat

über diesen Mechanismus vermittelt werden, brauchen also nicht in die Zelle einzudringen, sondern treten in Wechselwirkung mit dem Rezeptor an der Zellmembran, was für die Geschwindigkeit und Reversibilität des Effektes bedeutsam ist.

Am besten sind die Effekte des cAMP auf Enzyme des Glykogenabbaus in der Leber oder Muskulatur erforscht worden.
Unter der Einwirkung von Adrenalin (Sutherland and Rall, 1960) (in der Leber auch von Glucagon) wird in der Leber und im Muskelgewebe Glykogen durch ein "Phosphorylase" genanntes Enzym zu Glucose-1-phosphat abgebaut. Im Ruhezustand liegt die Muskel-Phosphorylase größtenteils in inaktiver Form (Phosphorylase b) vor und besteht aus zwei Untereinheiten. Durch Adrenalin bzw. cAMP werden zwei Phosphorylase-b-Moleküle in das katalytisch aktive, aus vier Untereinheiten bestehende Phosphorylase-a-Molekül überführt (Fischer et al., 1968). Gleichzeitig werden auf das Enzymprotein vier Phosphatgruppen vom ATP durch die aktive Phosphorylase-b-Kinase übertragen, die ebenfalls zur Aktivitätsentfaltung phosphoryliert werden muß. Diese Aktivierung wird durch eine weitere Kinase (aktive Phosphorylase-b-Kinase-Kinase) besorgt, ein Enzym, dessen Aktivität durch cAMP, den zweiten Boten des Adrenalins, "eingeschaltet" wird. Infolge eines Anstoßes dieser komplizierten Enzymkaskade durch Adrenalin in Augenblicken größeren Energiebedarfs steht der Zelle mehr Glucose zur Verfügung. Sobald Energiebedarf und Adrenalinspiegel sinken, gewinnt die Phosphorylase-Phosphatase die Oberhand, und die aktive Phosphorylase-a wird zur inaktiven Form dephosphoryliert.

Der Abbau des cAMP erfolgt über eine spezifische Nukleotid-3',5'-monophosphat-Phosphodiesterase (Butcher and Sutherland, 1962), wobei durch Hydrolyse 5'-AMP

entsteht. Das Enzym ist spezifisch für zyklische Nukleotide, und seine Aktivität ist so wie die der Adenylatzyklase von der Gegenwart bivalenter Kationen (Mg^{2+}, Mn^{2+}) abhängig. Die Phosphodiesterase ist hauptsächlich im Zytoplasma gelöst und nur teilweise an Membranstrukturen gebunden. Verschiedene Substanzen, z. B. die Methylxanthine Coffein, Theobromin und Theophyllin (Butcher and Sutherland, 1962), oder Papaverin und Dipyridamol (Pöch et al., 1969) hemmen die Phosphodiesterase-Aktivität und damit den Abbau von cAMP, was zum gleichen Effekt wie eine Aktivierung der Adenylatzyklase führt, nämlich zu einem Anstieg der intrazellulären 3',5'-AMP-Konzentration.

1.2. cAMP und Säuresekretion

Auf eine mögliche Beteiligung des cAMP bei der hormonellen Steuerung der Magensekretion haben erstmals Alonso und Harris (1965) hingewiesen. Sie zeigten an der isolierten Magenmucosa des Froschs, daß die Säuresekretion durch exogenes cAMP und Methylxanthine stimulierbar ist. Darüber hinaus wiesen sie nach, daß Methylxanthine den cAMP-Gehalt der Schleimhaut erhöhen, und zwar unmittelbar vor Anstieg der Säuresekretion (Harris et al., 1969). Obwohl inzwischen sehr viele weitere Untersuchungen nicht nur an der Magenschleimhaut von Amphibien, sondern auch von Säugern einschließlich des Menschen durchgeführt wurden, ist die Rolle des cAMP bei der Vermittlung der Säuresekretion durch Histamin, Gastrin und Azetylcholin noch nicht eindeutig geklärt (Übersichten bei Kimberg, 1974; Jacobson and Thompson, 1976; Ruoff and Sewing, 1977). Soviel ist jedoch aus Studien mit isolierten und angereicherten Parietalzellen (Soll and Wollin, 1977) und aus Studien mit menschlichem Biopsiematerial (Ruoff et al., 1979 a und b) klar, daß in den säuresezernierenden

Parietalzellen der Magenschleimhaut eine histaminempfindliche Adenylatzyklase [illegible] ist, die nur über Histamin-H_2-Rezeptoren aktiviert kann. Da die Histamin-stimulierte Säureproduktion ebenfalls über H_2-Rezeptoren ausgelöst wird, wird heute angenommen, daß dieser Prozeß über das cAMP-System vermittelt wird.

Neben der histaminstimulierbaren Adenylatzyklase kommt in der Magenschleimhaut noch ein Enzym vor, das auf Adrenalin und Prostaglandin E anspricht. In welchen [illegible] kommen, ist noch nicht ganz geklärt. Da aber das adrenalinempfindliche [illegible] gefunden wird, ist als sicher anzunehmen, daß außer Parietalzellen noch andere Zellen der Magenschleimhaut als Lokalisation in Frage kommen (Ruoff et al., 1977). Das gleiche gilt für das prostaglandinempfindliche Enzym, dessen Aktivität in parietalzellangereicherten Fraktionen geringer ist als in parietalzellarmen (Sonnenberg et al., 1976). Welcher Prostaglandineffekt mit der Wirkung auf die Adenylatzyklase verknüpft ist, ist noch unklar (Bolsa and Dozois, 1977).

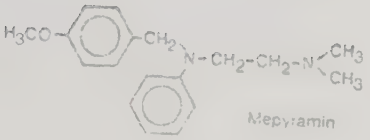
[illegible] H_2-Rezeptor-Antago-

[illegible] konventionellen Antihistaminika können nicht [illegible] antagonisiert werden. Z. B. wird [illegible] Effekt auf die Magensäuresekretion nicht verhindert. Auf Grund dieser u. a. Beobachtungen [illegible] Ash und Schild (1966), daß Histamin nicht [illegible], sondern mindestens mit zwei Rezeptortypen [illegible]. Ausgehend von dieser Hypothese entwickelten Black et al. (1972) einen neuen Histamin-Antagonisten und stellten eine neue Definition und Terminologie vor:

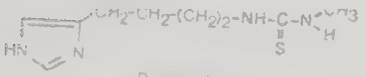
Rezeptoren, die durch traditionelle Antihistaminika blockiert werden, bezeichneten sie als Histamin-H_1-Rezeptoren. Rezeptoren, die nicht durch traditionelle Antihistaminika, aber durch den neuen Antagonisten blockierbar sind, als Histamin-H_2-Rezeptoren. Entsprechend werden die Blocker als Histamin-H_1- oder H_2-Rezeptor-Antagonisten bezeichnet. Die histaminergen H_1- und H_2-Rezeptoren sind nicht Untertypen ein und desselben Rezeptors, sondern stellen verschiedene Rezeptoreinheiten dar. So sind die H_2-Rezeptoren im Gegensatz zu den H_1-Rezeptoren eng an die membranständige Adenylatzyklase gekoppelt, die die Umwandlung von ATP in cAMP verursacht. Für die auf einer Stimulation von H_1-Rezeptoren beruhende Wirkung von Histamin konnte bis jetzt eine intrazelluläre Oberträgersubstanz nicht nachgewiesen werden (Reinhardt et al., 1977).

Abb. 2 zeigt die Struktur verschiedener Histamin-Antagonisten. Histamin-H_1-Rezeptor-Antagonisten wie Mepyramin sind im Vergleich zum Histamin vor allem am Ring verändert, während Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonisten wie Burimamid, Metiamid, Cimetidin und Ranitidin eine wesentlich abgewandelte Seitenkette aufweisen. Als erster H_2-Rezeptor-Antagonist wurde Burimamid am Menschen eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, daß die Substanz wegen unzureichender Resorption oral nicht wirksam war (Black et al., 1973). Das Nachfolgepräparat Metiamid besaß ein höheres Wirkungspotential; es war fünfmal stärker wirksam als Burimamid. Auch die enterale Resorption erwies sich als gut, so daß eine wirksame Unterdrückung der Magensekretion und eine klinisch belegte beschleunigte Abheilung von peptischen Ulcera nachgewiesen werden konnten. Da Metiamid jedoch unerwünschte Wirkungen am blutbildenden System (Agranulozytosen) hervorrief, mußte es von einer weiteren therapeutischen Verwendung ausgeschlossen werden (Forrest et al., 1975). Es folgte Cimetidin, bei

Histamin

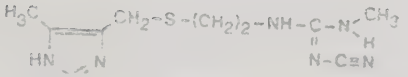


Mepyramin

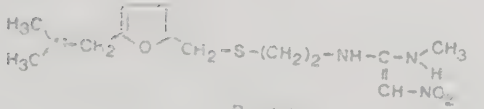


Burimamid

Metiamid



Cimetidin



Ranitidin . HCl

Fig. 2: Strukturformeln von Histamin, dem Histamin-H$_1$-Rezeptor-Antagonisten Mepyramin und den Histamin-H$_2$-Rezeptor-Antagonisten Burimamid, Metiamid, Cimetidin und Ranitidin

dem die Thioharnstoffgruppierung des Metiamids durch eine terminale Guanidingruppe substituiert ist.

Eine neue Substanz aus der Klasse der H_2-Rezeptor-Antagonisten ist Ranitidin. Es hat anstelle des Imidazolringes einen Furanring. In der Seitenkette dieses erst kürzlich entwickelten Histamin-H_2-Antagonisten befindet sich eine Nitroethenyliden-Gruppe. Ranitidin liegt in Salzform vor. Es ist besser löslich als Cimetidin.

Untersuchungen über Ranitidin sind Gegenstand eines Teils der vorliegenden Arbeit, deren Ziel die Gewinnung von Informationen über die Wirksamkeit von Ranitidin war, das nach Angaben des Herstellers zehnmal wirksamer als Cimetidin sein soll. Ein derartig potenter Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonist könnte für die Therapie des peptischen Ulcus möglicherweise eine Verbesserung bedeuten.

1.4. Durchgeführte Untersuchungen

Drei verschiedene Fragen wurden experimentell bearbeitet:

1) Da die Histamin-H_2-Rezeptoren abhängige Adenylatzyklase der Magenschleimhaut als ein in vitro Test-System eingesetzt werden sollte, um die inhibitorische Wirksamkeit von Cimetidin und Ranitidin miteinander zu vergleichen, wurden einige methodische Untersuchungen zur Optimierung des Enzymtests vorangestellt.
2) Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, um den Einfluß von Ranitidin und Cimetidin auf dieses System zu überprüfen und zu Aussagen über die molare Wirksamkeit beider Substanzen in der Magenschleimhaut des Meerschweinchens und der des Menschen zu gelangen.

3) Es wurde weiterhin die Adenylatzyklase-Aktivität der Fundusschleimhaut von Magengesunden und Patienten mit peptischem Ulcus untersucht. Es sollte geklärt werden, ob unter pathophysiologischen Bedingungen die histamin-, adrenalin- und prostaglandin E_2-empfindliche Adenylatzyklase charakteristischen Veränderungen unterliegt.

2. METHODIK

2.1 Untersuchungsmaterial

Für die tierexperimentellen Versuche wurde die Schleimhaut des Magenfundus junger männlicher Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 180 und 270 g verwendet (Zucht: Hugo Horner, Stadt-Allendorf 2 - Niederklein). Die Tiere erhielten Meerschweinchenfutter (Altromin Nr. 3012, Altromin GmbH, Lage/Lippe), Grünfutter, Karotten und Trinkwasser ad libitum.

Weiter wurden Biopsieproben (2,5 - 3 mg) aus dem Magenfundus von Patienten, die in der Zeit von August bis Dezember 1978 in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen wegen diagnostisch abzuklärender Oberbauchbeschwerden endoskopiert wurden, verwandt.
Das Biopsiematerial entstammte 28 magengesunden Personen (11 Frauen, 17 Männer, Durchschnittsalter: 43 Jahre), 11 Ulcus duodeni-Patienten, davon 5 ohne (1 Frau, 4 Männer, Durchschnittsalter: 47 Jahre) und 6 mit Cimetidin-Behandlung (1 Frau, 5 Männer, Durchschnittsalter 48 Jahre) und 10 Ulcus ventriculi-Patienten, davon 4 ohne (4 Männer, Durchschnittsalter: 53 Jahre) und 6 mit Cimetidin-Behandlung (1 Frau, 5 Männer, Durchschnittsalter: 52 Jahre).
Die Biopsieproben wurden nach einer zwölfstündigen Nüchternperiode vormittags, zwischen 9 und 12 Uhr mit einer normalen Biopsiezange entnommen. Die Prämedikation der Patienten bestand aus 0,5 mg Atropin und bei Erfordernis zusätzlich 20 mg Hyoscin-N-butylbromid (Buscopan®).

2.2. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Die Tiere wurden gewogen, durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Der Abdomen wurde eröffnet und der Magen entnommen. Nach Abtrennung des Antrums wurde der Pylorus entlang der kleinen Kurvatur aufgeschnitten, vom Inhalt befreit und im Homogenisationspuffer, bestehend aus 95 - 10^{-3} mol/l Tris-HCl -pH 7.2 -, 10^{-2} mol/l Äthylendiaminotetraessigsäure (EDTA) und 10^{-3} mol/l Dithiothreitol (DTT), gewaschen. Der geöffnete Magen wurde dann mit Stecknadeln auf ein Präparierbrett gespannt und durch leichtes Betupfen mit Mull abgetrocknet. Die Schleimhaut wurde abgeschabt, gewogen und in derselben eisgekühlter Lösung durch Beschallung homogenisiert (10 mg Gewebe/3 ml).
Bei dieser Methode wird hochfrequente elektrische Energie mittels eines piezoelektrischen Elementes in mechanische Schwingungen umgewandelt, die über eine geeignete Titansonde in die zu beschallende Substanz geleitet werden.
Verwendet wurde ein Ultraschallgerät (Firma Branson), bei welchem durch die Pulsiereinrichtung jede Betriebssekunde in aktive Ultraschall- und Ruhezeit, und zwar in jedem beliebigen Verhältnis zwischen 0,1 und 0,9 sec. unterteilt werden kann. Durch diesen "intermittierenden" Betrieb wurden die Beschallung wärmeempfindlicher Substanzen bei reproduzierbaren Zeiten erleichtert und eine bessere Vermengung des Materials erreicht. Die Regulierbarkeit der abgestrahlten Schallenergie ermöglicht es, bestimmte Bestandteile einer Lösung aufzubrechen und stabilere unbeschädigt zu lassen.

Von der Entnahme der Biopsieproben aus der Magenschleimhaut des Menschen bis zu ihrer Lagerung im Tiefkühlschrank bei -20° C verging ca. 1 Minute. Zur Messung der Adenylatzyklase-Aktivität wurde die Probe gewogen

und anschließend homogenisiert. Ein Teil der Proben wurde mit Ultraschall behandelt, die übrigen mit einem Glas-Teflon-Homogenisator vorsichtig mit der Hand homogenisiert.

2.3. Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität

Als Maß der Adenylatzyklase-Aktivität (Ruoff and Sewing, 1975) wurde das pro Zeiteinheit und mg Gewebe bzw. mg Protein gebildete cAMP bestimmt.

Das Inkubationsmedium des Enzymtests bestand aus:
10^{-3} mol/l ATP als Substrat,
10^{-2} mol/l $MgCl_2$, da die Bildung von cAMP aus ATP an die Gegenwart eines bivalenten Kations (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) gebunden ist,
$25 \cdot 10^{-3}$ oder $200 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tris-HCl -pH 7,8- als Inkubationspuffer,
10^{-2} mol/l Theophyllin als Phosphodiesterase-Inhibitor, um den Abbau des neugebildeten cAMP zu verhindern,
1 mg/ml Albumin zur Stabilisierung der Enzymaktivität,
$15{,}6 \cdot 10^{-3}$ mol/l Kreatinphosphat und
333 µg/ml Kreatinkinase als ATP-regenerierendes System.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms in Form des Homogenats gestartet und durch dreiminütiges Erhitzen in einem Metallblock bei 120° C abgestoppt.
Inkubiert wurden für die Routinemessung jeweils 100 µg Gewebe. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 170 µl, die Inkubationsdauer 20 Minuten und die Temperatur 37° C.
Nach der Denaturierung des Enzyms durch Erhitzen wurde jeder Probe 30 mg Al_2O_3 zugegeben, um bei der cAMP-Messung störendes ATP zu beseitigen. Das Gemisch wurde

mit dem Vortex gesch[illegible]t und für 2 Minuten bei [illegible] g zentrifugiert. Vom Überstand werden zweimal 50 µl zur cAMP-Bestimmung eingesetzt.

Nullwert: Nach Zugabe des Homogenats erfolgte ein sofortiger Hitzestop. Die in dieser Probe gefundene cAMP-Menge wurde der jeweils gemessenen Enzymaktivität als Nullwert abgezogen.

2.4. cAMP-Bestimmung mit dem Gilman-Test (Gilman, 1970)

Bindungsprotein:
Zur Messung von cAMP nach dieser Methode wird ein spezifisches Bindungsprotein benötigt. Dieses Protein, es handelt sich um eine Proteinkinase aus Rindermuskel, war nach der Methode von Miyamoto et al. (1969) im Labor bereits hergestellt worden. Es wurde tiefgefroren gelagert und stand für die Messungen zur Verfügung.

Prinzip:
Das Prinzip der Methode besteht darin, daß radioaktiv markiertes cAMP reversibel mit dem Bindungsprotein reagiert und durch nicht radioaktives ("kaltes") cAMP (Standard oder Probe) aus seiner Bindung verdrängt werden kann. Das Ausmaß der Verdrängung der radioaktiven Liganden ist der Menge des zugesetzten "kalten" cAMP proportional. Die Trennung von freier und gebundener Radioaktivität erfolgt bei dieser Methode mittels Filtration. Der Proteinkomplex wird an einen Zellulosenitratfilter adsorbiert und anschließend die gebundene Radioaktivität gezählt. Die vorhandene Menge cAMP wird anhand von Standardkurven ermittelt.

Durchführung:
Der Testansatz bestand aus folgenden Komponenten:
1) Bindungsprotein in ausreichender Menge, um 30 % des markierten cAMP zu binden,
2) 0,4 pmol ^{3}H-cAMP (Spezifische Aktivität 52 Ci/mmol),
3) Probe oder Standard (0,5 - 5 pmol).
Das Endvolumen des Testansatzes betrug 170 µl.
Nach 3 Stunden im Eis hat sich ein Gleichgewicht eingestellt, und die Proben wurden nach diesem Zeitraum filtriert. Benutzt wurden Zelluloseesterfilter, die anschließend in einem Zählgläschen mit 1 ml Cellosolve (Äthylenglycolmonoäthyläther und Äthylenglycolmonomethyläther, 1:1) aufgelöst und mit 10 ml Szintillator (Diotol) versetzt wurden. Nach einstündiger Adaptation erfolgte die Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler. Bei jeder durchgeführten Meßreihe liefen 6 Standardkurven mit jeweils 0,5; 1; 2; 3 und 5 pmol cAMP/Ansatz mit. Bei doppelt-logarithmischer Auftragung der eingesetzten cAMP-Menge gegen die Counts/min ist die Standardkurve geradlinig. Mittels eines Programms und Rechners (Hewlett-Packard hp 20) wurden die Kurven berechnet und aus diesen die unbekannte cAMP-Menge der Proben bestimmt.

2.5. Proteinbestimmung der Homogenate nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die bei der Reaktion auftretende Blaufärbung beruht 1. auf der Biuretreaktion des Proteins mit Cu^{2+} im alkalischen Milieu und 2. auf der Reduktion der Phosphormolybdän-Phosphorwolframsäure durch anwesende aromatische Aminosäuren wie Tyrosin oder Tryptophan. Die Farbintensität ist der Proteinmenge direkt proportional. Die Methode ist empfindlich und erfaßt bis zu 0,2 µg Protein. Als Standard wurde Serum-Albumin vom Rind benutzt. Die Extinktion wurde bei 750 nm gemessen.

2.6. Auswertung der Versuche

In früheren Untersuchungen mit Biopsiematerial hat sich gezeigt, daß die Werte der basalen und histaminstimulierten Adenylatzyklase logarithmisch normal verteilt sind (Ruoff et al., 1979 b). Deshalb wurden sämtliche Berechnungen, wie Mittelwerte und ihre Fehler, sowie die statistischen Teste (t-Test für Paare und Gruppen) mit den Logarithmen der Werte durchgeführt.

Der Vergleich Cimetidin und Ranitidin wurde experimentell mit zwei Verfahren durchgeführt.

1) Die durch Histamin maximal stimulierte Adenylatzyklase wurde durch ansteigende Konzentrationen Cimetidin oder Ranitidin gehemmt. Auf diese Weise konnte die jeweilige Antagonisten-Konzentration ermittelt werden, mit der eine halbmaximale Hemmung erreicht wird ($IC_{50\%}$).
2) Durch Histamin-Konzentrationswirkungskurven der Adenylatzyklase-Aktivierung ohne und in Gegenwart von Cimetidin oder Ranitidin konnte die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, d. h. die Antagonist-Konzentration, bei welcher in Abwesenheit des Agonisten 50 % der Rezeptoren besetzt sind, im folgenden K_i-Wert (Inhibitorkonstante)genannt, nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\frac{1}{K_i} = \frac{1}{A} (DR - 1)$$

In dieser Gleichung bedeutet A die Konzentration des Antagonisten und DR (dose ratio) das Verhältnis der Histaminkonzentrationen, die benötigt wurden, um den halbmaximalen Effekt (ED_{50}) mit und ohne Blocker zu erreichen. Die Bestimmung der ED_{50} erfolgte direkt aus der Konzentrationswirkungskurve, da die üblichen Verfahren (Lineweaver and Burk, 1934; Eadie, 1942, 1952; Hofstee, 1952) für die lineare Trans-

formation der sehr flachen Aktivierungskurve der Adenylatzyklase durch 10^{-7} - 10^{-2} mol/l Histamin nicht angewandt werden konnten.

2.7. Verwendete Substanzen

2,8-^{3}H Adenosin 3', 5'-phosphat, zyklisch, Ammoniumsalz in Äthanol 50 %, 52 Ci/mmol; (Radiochemical Centre, Amersham, England)

Adenosin 3', 5'-phosphat, zyklisch, reinst; (Serva, Heidelberg)

Adenosin 5'-triphosphat Dinatriumsalz; (Boehringer, Mannheim)

L-Adrenalin-D-hydrogentartrat, reinst; (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz)

Albumin, Serum-Albumin vom Rind, trocken, reinst; (Behringwerke AG, Marburg/Lahn)

Aluminiumoxid, 90 aktiv, neutral (aktiver I nach Brockmann); (Merck, Darmstadt)

Äthanol, DAB 7, p.a., absolut; (Karl Roth KG, Karlsruhe)

Äthylenglycolmonoäthyläther (zur Synthese); (Merck, Schuchardt)

Äthylenglycolmonomethyläther (zur Synthese); (Merck, Schuchardt)

>Cimetidin< , Tagamet®,
N"-Cyan-N-methyl-N'-(2{({5-methyl-1H-imidazol-4-yl}
methyl) thio)-äthyl)-guanidin;
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:
Dr.M.E. Parsons, SK & F, Welwyn Garden City, U.K.)

Dioxan, stab. mit 20 ppm. Kerobit;
(BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen)

DTT; 1,4-Dithiothreitol;
(EGA-Chemie, Keppler und Ruf, Steinheim/Albuch)

EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz,
Titriplex III®;
(Merck, Darmstadt)

Essigsäure 100 % (ca. 1,05),
indifferent gegen Chromsäure, Eisessig;
(Merck, Darmstadt)

Folin-Ciocalteus, Phenolreagenz;
(Merck, Darmstadt)

GTP, Guanosin 5'-triphosphat Dinatriumsalz, reinst;
(Serva, Heidelberg)

Histamin-dihydrochlorid, DAB 7;
(Merck, Darmstadt)

Kaliumnatriumtartrat, Seignette Salz, krist.;
(Merck, Darmstadt)

Kreatin-Kinase vom Kaninchen-Muskel,
~40 U/mg 2 x krist.;
(Serva, Heidelberg)

Kreatin-phosphat Dinatriumsalz, reinst;
(Serva, Heidelberg)

Kupfer (II)-sulfat, gepulvert, reinst;
(Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid;
(Merck, Darmstadt)

BA 85 Membranfilter;
(Schleicher & Schüll GmbH, Dassel)

Mepyramin-maleat;
(Rhône-Poulenc, Paris, Frankreich)

Methanol;
(BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen)

Naphthalin, zu Szintillationsmessungen;
(Merck, Darmstadt)

Natriumacetat,
indifferent gegen Kaliumpermanganat, krist.;
(Merck, Darmstadt)

Natriumcarbonat, B.P.C. 1968 Ph. Helv. V.,
wasserfrei, reinst;
(Merck, Darmstadt)

Natriumfluorid;
(Merck, Darmstadt)

1 N Natronlauge, Titrisol®;
(Merck, Darmstadt)

POPOP, 2,2'-p-Phenylenbis (4-methyl-5-phenyloxazol),
zu Szintillationsmessungen;
(Merck, Darmstadt)

PPO, 2,5 Diphenyloxazol,
zu Szintillationsmessungen;
(Merck, Darmstadt)

Prostaglandin E_2, >Dinoproston<,
(5 Z, 11 α, 13 E, 15 S) - 11,15 - Dihydroxy-
9 - oxo - prosta - 5,13 - diensäure;
(Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA)

>Ranitidin<
N- (2-(((5-((Dimethylamino) methyl)-2-furanyl) methyl)
thio) äthyl) -N'-methyl-2-nitro-1,1-äthendiamin-
hydrochlorid;
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:
Dr. R.A. Richards, Glaxo-Allenbury Research, Ware, U.K.)

Salzsäure, min. 32 %, zur Analyse;
(Merck, Darmstadt)

Theophyllin, krist. rein;
(Merck, Darmstadt)

Toluol, Reintoluol;
(Aral Aktiengesellschaft, Bochum)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan;
(Merck, Darmstadt)

2.8. Lösungen

Diotol-Szintillator:

3,75	l	Toluol dest.
3,75	l	Dioxan dest.
2,22	l	Methanol reinst
780	g	Naphthalin
50,25	g	PPO
975	mg	POPOP

Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry:

a) 2,7 g/ 100 ml Kaliumnatriumtartrat
b) 1,0 g/ 100 ml Kupfersulfat
c) 19,64 g/1000 ml Natriumcarbonat

Die Mischung ist frisch herzustellen:

0,5 ml a)
0,5 ml b)
49,0 ml c)

Das käufliche Phenolreagenz wird mit Aq.dest. 1:1 versetzt. Gegen Phenolphthalein soll die Säurekonzentration ca. 1 N betragen.

Protein-Standard:
Stammlösung: Serum-Albumin vom Rind 1 mg/ml
Daraus werden entsprechende Verdünnungsreihen für die Standardkurve hergestellt.

Durchführung:
100 µl Probe
100 µl 1N NaOH
1 ml der frisch anzufertigenden Lösung wird gemischt und 10 Minuten gewartet. 100 µl Folin wird zugegeben und 30 Minuten gewartet.

Cimetidin-Stammlösung:
252 mg Cimetidin werden in 1,1 ml 1 N HCl gelöst. Hinzupipettiert werden 2,0 ml 0,1 N NaOH und mit Aq.dest. aufgefüllt bis zur Meßmarke von 10 ml. Man erhält eine leicht hypotonische Lösung von 100 mmol/l mit einem pH-Wert von 6,0.
Bei pH 7 sind wässrige Lösungen für 7 Tage bei Raumtemperatur haltbar.

Prostaglandin E_2-Stammlösung:
Die Stammlösung wird in absolutem Äthanol hergestellt. Die wässrige Lösung ist bei 4^0 C für 7 Tage haltbar.

2.9. Geräte

Ultraschallgerät zur biologischen Forschung (Zellzerkleinerung, "Modell B - 15 P";
Branson Schallkraft AG, Heusenstamm
Betriebs-Nennfrequenz 20 KHz $\pm$ 10 %,
HF-Nennleistung: 150 W

Eppendorf-Zentrifuge; Netheler und Hinz GmbH
max. Drehzahl 12.000 U/min., Leistung 100 VA

Dilumatik; Braun Melsungen AG

Isocap/300; Searle, Nuclear Chicago Division
Liquid Scintillation System

Photometer; Carl Zeiss

Calculator;
a) Hewlett-Packard 97
b) Hewlett-Packard hp 20

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zur Methodik des Adenylatzyklase-Tests

3.1.1. Gewebehomogenisation (Abb. 3)

Es wurden zwei Homogenisationsverfahren miteinander verglichen:

1. Homogenisation mit einem Glas-Teflon-Homogenisator:
   a) schonend, 3 Schläge innerhalb von 0,5 min (Homogenisation I) und
   b) stark, 15 - 20 Schläge innerhalb von 1 min (Homogenisation II).

Die Drehung des Homogenisators betrug ca. 2000 U/min.

2. Beschallung mit dem Branson Sonifier Cell Disruptor B-15:
   a) schonend, "power 20, pulsed 20 % duty cycle", 5 min, entsprechend einer Geräteleistung von ca. 84 Watt (Sonifikation I) und
   b) stark, "power 30, pulsed 40 % duty cycle", 5 min, entsprechend ca. 168 Watt (Sonifikation II).

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, werden nach Anwendung der verschiedenen Homogenisationstechniken unterschiedliche Enzymaktivitäten gemessen.
Die Basalaktivität wird von 139 pmol cAMP/mg Protein/20 min (Homogenisation I) auf 48 pmol (Homogenisation II) und von 80 pmol (Sonifikation I) auf 27 pmol (Sonifikation II) reduziert.
Stimulation durch 10^{-3} mol/l Histamin steigert die Basalaktivität nach Homogenisation I 5,7fach

auf 796 pmol cAMP/mg Protein/20 min, nach Homogenisation II 13,2fach auf 635 pmol cAMP. Nach Sonifikation I steigt die Basalaktivität durch Histamin 4,7fach auf 375 pmol cAMP/mg Protein/ 20 min und nach Sonifikation II 1,7fach auf 47 pmol cAMP an.

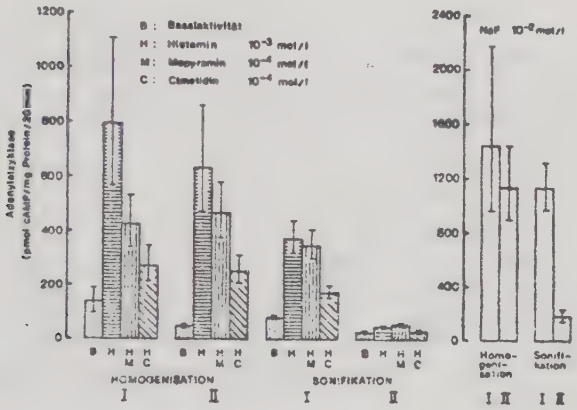


Abb. 3: Adenylatzyklase-Aktivität (pmol cAMP/mg Protein/ 20 min) aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens nach zwei verschiedenen Verfahren der Gewebe-Homogenisation, die jeweils "schwach" oder "stark" angewandt wurden.
Homogenisation I : 3 Schläge/0,5 min
Homogenisation II: 15 - 20 Schläge/1 min, jeweils mit einem Glas-Teflon-Homogenisator.

Sonifikation I : Power 20, pulsed 20 % duty cycle, 5 min, entsprechend etwa 84 Watt
Sonifikation II: Power 30, pulsed 40 % duty cycle, 5 min, entsprechend etwa 168 Watt
mit dem Branson Sonifier Cell Disruptor B-15
N = 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

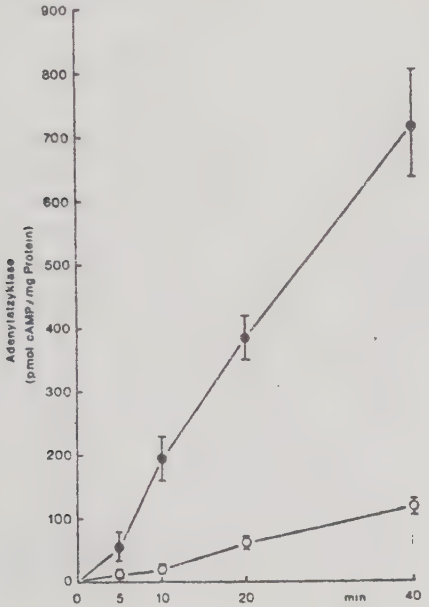
Der H_1-Antagonist Mepyramin (10^{-4}mol/l) reduziert signifikant ($p<0,05$) die mit 10^{-3} mol/l Histamin stimulierte Adenylatzyklase um fast die Hälfte (Homogenisation I) und um 1/3 (Homogenisation II). Nach Sonifikation I und II zeigt sich durch Mepyramin kein signifikanter Unterschied.

Histamin-H_2-Rezeptoren-Blockade durch 10^{-4} mol/l Cimetidin bewirkt nach allen Homogenisationstechniken eine signifikante Hemmung der histaminstimulierten Adenylatzyklase, und diese Substanz war in allen Fällen effektiver als Mepyramin.

Wie erwartet, werden durch 10^{-2} mol/l NaF die höchsten Aktivitäten erreicht. Nach Homogenisation I und II 1436 bzw. 1129 pmol cAMP/mg Protein/20 min, nach Sonifikation I 1138 pmol cAMP, nach II jedoch nur noch 188 pmol cAMP/mg Protein/20 min.

Zusammengefaßt läßt sich damit feststellen, daß nach Bearbeitung des Gewebes durch Homogenisation I und II eine höhere Enzymaktivität gemessen wird als nach Sonifikation I und insbesondere II. Dieses letztere Verfahren scheint die Adenylatzyklase so stark zu beeinträchtigen, daß selbst der potenteste Aktivator der Adenylatzyklase, NaF, kaum noch aktivierende Wirkung zeigt. Auf der anderen Seite sind jedoch nach Beschallung des Gewebes die Fehler der Mittelwerte wesentlich kleiner. Deshalb und weil die Spezifität des Histamin-H_2-Rezeptors mit diesem Verfahren besser gewährleistet erschien, wurde für die Versuche mit der Magenschleimhaut des Meerschweinchens Sonifikation I beibehalten.

Bei den Versuchen mit menschlicher Mucosa war nach Beschallung die Stimulation der Adenylatzyklase allerdings zu gering (s. Versuche mit GTP, Abb.7). Die Fundusschleimhaut des Menschen wurde deshalb zum größten Teil entsprechend dem Verfahren Homogenisation I bearbeitet.



b. 4: Zeitabhängigkeit der basalen (o—o) und der durch 10^{-3} mol/l Histamin (•—•) stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität (pmol cAMP/mg Protein) aus der Magenschleimhaut eines Meerschweinchens
N = 8 (Meßwerte aus einem Homogenat),
Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.2. Inkubationsdauer (Abb. 4)

Aus dem Homogenat eines Meerschweinchens wurden pro Ansatz 21 µg Protein (entsprechend 100 µg Feuchtgewicht Gewebe) für 5, 10, 20 und 40 min ohne (Basalaktivität) und mit 10^{-3} mol/l Histamin inkubiert und das jeweils gebildete cAMP gemessen.

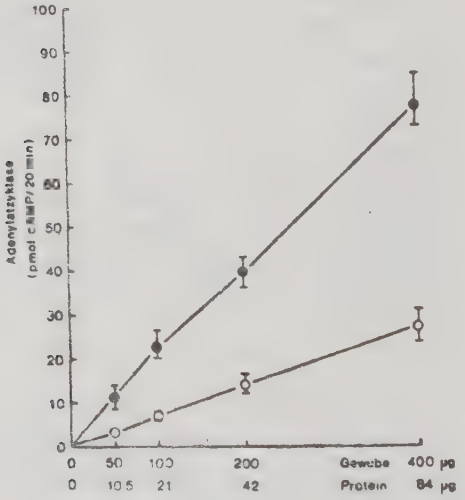


Abb. 5: Basale (o—o) und durch 10^{-3} mol/l Histamin (•—•) stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität (pmol cAMP/ 20 min) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration der Magenschleimhaut eines Meerschweinchens

Pro Testansatz wurden 50, 100, 200 und 400 µg Gewebe, entsprechend 10,5 - 84 µg Protein für 20 Minuten inkubiert.
N = 8 (Meßwerte aus einem Homogenat),
Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Die Reaktion verlief über 40 min annähernd zeitlinear. Unter Basalbedingungen betrug die cAMP-Bildung im Mittel 3 pmol/mg Protein/min, nach Histaminstimulation 16 pmol/mg Protein/min, d. h. Histamin steigert die Syntheserate auf das Sechsfache.

3.1.3. Proteinkonzentration (Abb. 5)

Es wurden, wieder aus dem Homogenat eines Meerschweinchens, 10,5; 21; 42 und 84 µg Protein (entsprechend 50 - 400 µg Feuchtgewicht Gewebe) für 20 min ohne und mit 10^{-3} mol/l Histamin inkubiert. Es ergibt sich eine annähernd lineare Beziehung zwischen eingesetzter Proteinmenge und gebildeter cAMP-Menge. In diesem Versuch betrug die Syntheserate 16 pmol cAMP/mg Protein/min unter Basalbedingungen und 50 pmol cAMP/mg Protein/min nach Histaminstimulation, was einer dreifachen Steigerung entspricht.

3.1.4. pH (Abb. 6)

Untersucht wurde die Aktivität der Adenylatzyklase bei verschiedenen pH-Werten. Mit Tris-HCl in einer Konzentration von 200 · 10^{-3} mol/l wurde das Inkubationsmedium in Intervallschritten von 0,4 pH-Einheiten auf Werte zwischen 6,2 - 9,0 eingestellt. Bestimmt wurden basale, histamin-(10^{-3} mol/l) und NaF-(10^{-2} mol/l) stimulierte Aktivität. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,8. Die Adenylatzyklase-Aktivität wird durch saures Milieu stärker beeinträchtigt als durch alkalisches.

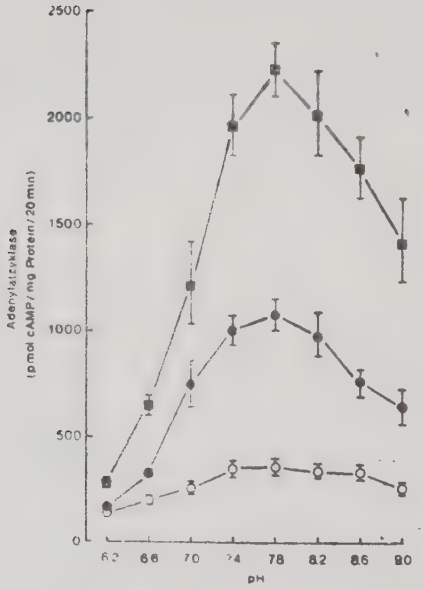
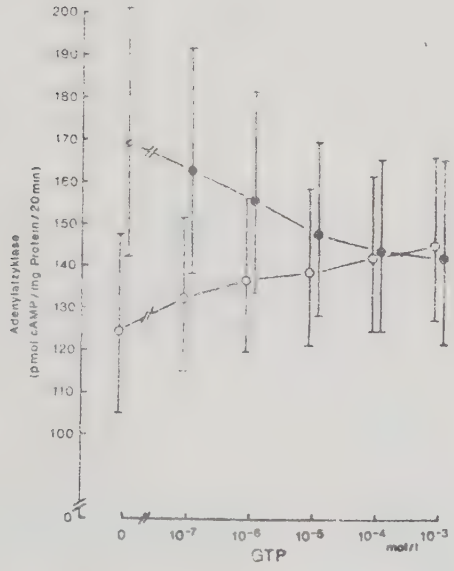


Abb. 6: Basale (o—o), durch 10^{-3} mol/l Histamin (●—●) und 10^{-2} mol/l NaF (■—■) stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität der Magenschleimhaut des Meerschweinchens in Abhängigkeit vom pH-Wert des Inkubationsmediums
N = 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.5. GTP (Abb. 7)

In Anwesenheit ansteigender GTP-Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-3} mol/l) wurde 100 µg normale Fundusschleimhaut des Menschen, homogenisiert mittels Sonifikation I, inkubiert. Der Basalwert liegt bei 124 pmol cAMP/mg Protein/20 min und steigt

durch Stimulation mit 10^{-3} mol/l Histamin auf 169 pmol cAMP/mg Protein/20 min an. Durch GTP nimmt die Basalaktivität konzentrationsabhängig von 125 auf 145 pmol cAMP/mg Protein/20 min (10^{-3} mol/l GTP) zu, die mit 10^{-3} mol/l Histamin stimulierte Adenylatzyklase sinkt dagegen von 169 auf 142 pmol cAMP/mg Protein/20 min ab.



bb. 7: Einfluß von 10^{-7} - 10^{-3} mol/l GTP auf die basale (o—o) und die durch 10^{-3} mol/l Histamin (•—•) stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität menschlicher Fundusschleimhaut
N = 6, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.1.6. Bedingungen für die Routinemessungen

Homogenisation: Wie schon erwähnt, wird die Magenschleimhaut des Meerschweinchens mit Sonifikation I, das Biopsiematerial aus der Fundusschleimhaut des Menschen zum größten Teil durch Homogenisation I aufgearbeitet.

Zeitdauer der Inkubation: 20 min (bei 37^{o} C); Proteinkonzentration: ca. 21 µg Protein pro Ansatz (entsprechend 100 µg Gewebe); Inkubationspuffer: $25 \cdot 10^{-3}$ mol/l bzw. bei einigen Versuchen $200 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tris-HCl-Puffer -pH 7,8-.

Die übrigen Komponenten des Adenylatzyklase-Tests und ihre Konzentrationen sind in der Methodik angegeben. Unter diesen Bedingungen und Messung des cAMP mit dem Gilman-Test können noch Enzymaktivitäten im Bereich von 1 pmol cAMP/Ansatz erfaßt werden.

3.2. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit von Cimetidin und Ranitidin (Magenschleimhaut des Meerschweinchens)

3.2.1. Einfluß auf die Basalaktivität (Abb. 8)

Der Einfluß von Mepyramin, Cimetidin und Ranitidin wird in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-7} - 10^{-3} mol/l untersucht. Der basale Ausgangswert liegt bei 143 pmol cAMP/mg Protein/20 min. Durch 10^{-7} mol/l Mepyramin wird die Enzymaktivität auf 158 pmol cAMP/mg Protein/20 min gesteigert und fällt dann konzentrationsabhängig, durch 10^{-3} mol/l auf 107 pmol cAMP/mg Protein/20 min ab.

10^{-7} und 10^{-6} mol/l Ranitidin verändern die Basalaktivität nicht. Bei höheren Konzentrationen nimmt sie jedoch ab und beträgt unter 10^{-3} mol/l noch 95 pmol cAMP/mg Protein/20 min.

Am stärksten ist der Abfall unter dem Einfluß von Cimetidin. Schon durch 10^{-6} mol/l nimmt die Aktivität ab und erreicht in Gegenwart von 10^{-3} mol/l einen Wert von 90 pmol cAMP/mg Protein/20 min.

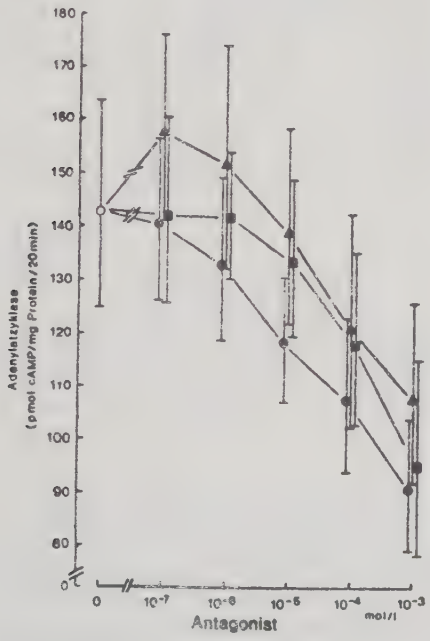


Abb. 8: Einfluß von Mepyramin (▲—▲), Cimetidin (●—●) und Ranitidin (■—■) (10^{-7} - 10^{-3} mol/l) auf die Basalaktivität (o) der Magenschleimhaut des Meerschweinchens
N = 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Signifikante Unterschiede der Adenylatzyklase-Aktivität innerhalb der verschiedenen Konzentrationen der drei untersuchten Substanzen liegen nicht vor.

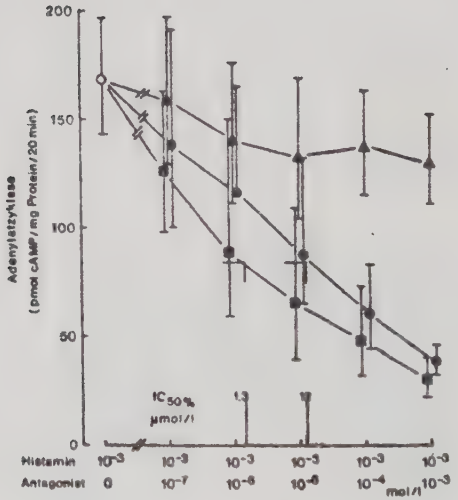


Abb. 9: Einfluß von Mepyramin (▲—▲), Cimetidin (●—●) und Ranitidin (■—■) (10^{-7} - 10^{-3} mol/l) auf die mit 10^{-3} mol/l Histamin (o) stimulierte Adenylatzyklase der Magenschleimhaut des Meerschweinchens N = 8, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.2.2. Einfluß auf die maximal histaminstimulierte Adenylatzyklase (Abb. 9)

Nach Abzug der basalen Aktivität beträgt die cAMP-Bildungsrate der Adenylatzyklase in Gegenwart von 10^{-3} mol/l Histamin 168 pmol cAMP/mg Protein/20 min. Dieser Histamineffekt wird durch 10^{-3} mol/l, der höchsten Mepyraminkonzentration, um 23 % gehemmt. Demgegenüber sind Cimetidin und Ranitidin bedeutend wirksamer; sie verursachen durch 10^{-3} mol/l eine 67 %ige bzw. 86 %ige Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität. Darüberhinaus kann aus diesen Kurven die IC_{50} abgelesen werden. Sie beträgt für Ranitidin 1,3 µmol/l und für Cimetidin 12 µmol/l. Nur in einer Konzentration, nämlich 10^{-5} mol/l, unterscheiden sich Cimetidin und Ranitidin in ihrer Hemmwirkung signifikant ($p<0,05$).

3.2.3. Einfluß auf die Histamin-Konzentrationswirkungskurve

Die Ergebnisse der Abb. 10 und 11 wurden innerhalb einer Versuchsserie ermittelt. Es sind jeweils drei Konzentrationswirkungskurven dargestellt, die

1. mit Histamin in Konzentrationen von 10^{-7}- 10^{-2} mol/l,
2. mit Histamin plus 10^{-6} bzw. 10^{-4} mol/l Cimetidin und
3. mit Histamin plus 10^{-6} bzw. 10^{-4} mol/l Ranitidin ermittelt wurden.

3.2.3.1. Einfluß von 10^{-6} mol/l Cimetidin und Ranitidin (Abb. 10)

Ausgehend von einem Basalwert von 184 pmol cAMP/mg Protein/20 min erstreckt sich die Stimulation der Adenylatzyklase über einen weiten Konzentrationsbereich von 10^{-7} - 10^{-3} mol/l. Die Histaminkurve ist S-förmig.

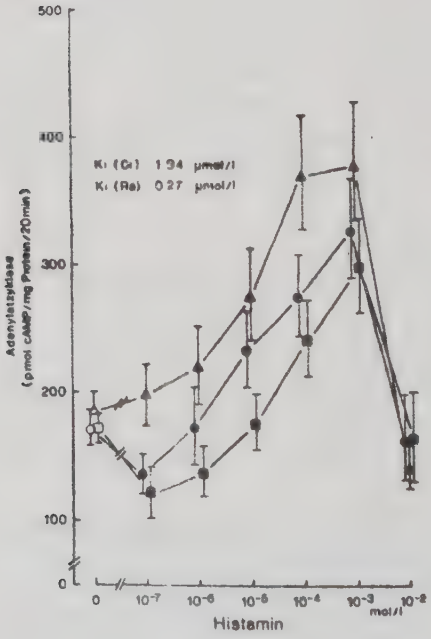


Abb. 10: Aktivierung der Adenylatzyklase (Δ,o,□) der Magenschleimhaut des Meerschweinchens durch 10^{-7} - 10^{-2} mol/l Histamin (▲—▲) ohne und in Gegenwart von 10^{-6} mol/l Cimetidin (●—●, Ci) oder Ranitidin (■—■, Ra)
N = 7, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

Die maximale Stimulation erfolgt bei 10^{-3} mol/l und erreicht eine Syntheserate von 377 pmol cAMP/mg Protein/20 min. Eine Steigerung der Histaminkonzentration auf 10^{-2} mol/l bewirkt keine weitere Aktivierung der Adenylatzyklase, es kommt vielmehr zu einem völligen Aktivitätsverlust. Wie sich durch pH-Messungen des Inkubationsmediums zeigt, wird die Pufferkapazität von 25 · 10^{-3} mol/l Tris-HCl durch diese hohe Histaminkonzentration überschritten. Der pH-Wert des Mediums sinkt von 7,8 auf 6,3 ab.

Unter 10^{-6} mol/l Cimetidin und Ranitidin werden fast identische Werte um 170 pmol cAMP/mg Protein/20 min, nur wenig unterhalb des Basalwertes, gefunden. Durch Zusatz von 10^{-7} mol/l Histamin nimmt jedoch die Aktivität in Gegenwart der Antagonisten erst einmal ab; unter Cimetidin sinkt sie auf 135 pmol cAMP/mg Protein/20 min und unter Ranitidin auf 120 pmol cAMP/mg Protein/20 min ($p>0,05$). Cimetidin und Ranitidin verschieben die Histamin-Konzentrationswirkungskurve parallel nach rechts, Ranitidin stärker als Cimetidin. Der maximale Histamineffekt wird durch Cimetidin um 19 % und durch Ranitidin um 35 % gehemmt. Ein signifikanter Unterschied in der inhibitorischen Wirkung von Cimetidin und Ranitidin findet sich bei der durch 10^{-6} und 10^{-5} mol/l Histamin stimulierten Adenylatzyklase ($p<0,05$).

Wenn auch die Art des Hemmtyps aus diesen Kurven nicht sicher ermittelt werden kann, da unter den gegebenen Umständen höhere Histaminkonzentrationen nicht ausgetestet werden konnten, wurde unter der Annahme eines kompetitiven Hemmechanismus der K_i-Wert trotzdem ermittelt. Für Cimetidin ergab sich ein Wert von 1,9 µmol/l, für Ranitidin von 0,27 µmol/l.

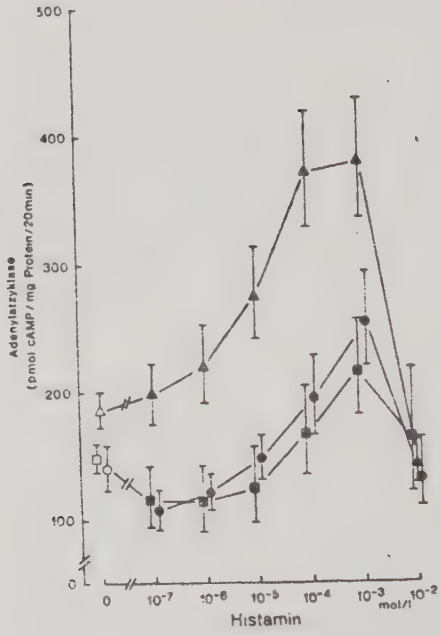


Abb. 11: Aktivierung der Adenylatzyklase (△,○,□) der Magenschleimhaut des Meerschweinchens durch 10^{-7} - 10^{-2} mol/l Histamin (▲—▲) ohne und in Gegenwart von 10^{-4} mol/l Cimetidin (●—●) oder Ranitidin (■—■)
N = 7, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.2.3.2. Einfluß von 10^{-4} mol/l Cimetidin und Ranitidin (Abb. 11)

Mit 139 pmol cAMP/mg Protein/20 min durch 10^{-4} mol/l Cimetidin und 149 pmol cAMP/mg Protein/20 min durch 10^{-4} mol/l Ranitidin lag der Ausgangswert der Konzentrationswirkungskurve wie erwartet unter dem Basalwert ($p<0,01$).

Wiederum fällt durch 10^{-7} mol/l Histamin die Aktivität erst einmal ab, durch Cimetidin auf 106 pmol und durch Ranitidin auf 116 pmol cAMP/mg Protein/20 min.

Ranitidin verschiebt die Konzentrationswirkungskurve wieder weiter nach rechts als Cimetidin. Cimetidin hemmt den maximalen Histamineffekt um 41 %, Ranitidin um 66 %. Bei dieser Konzentration der Antagonisten läßt sich ein signifikanter Unterschied in der inhibitorischen Wirkung der beiden Blocker nicht mehr feststellen.

3.2.4. Einfluß auf die Histamin-Konzentrationswirkungskurve bei höherer Pufferkapazität (Abb. 12)

Um auch die Wirkung von 10^{-2} mol/l Histamin testen zu können, wurde die Pufferkonzentration von $25 \cdot 10^{-3}$ mol/l auf $200 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tris-HCl - pH 7,8 - erhöht. Unter diesen Bedingungen liegt der Basalwert etwas höher bei 430 pmol cAMP/mg Protein/20 min, und 10^{-2} mol/l Histamin hat tatsächlich mit einer Aktivität von 1194 pmol cAMP/mg Protein/20 min die höchste stimulierende Wirkung. Mit 374 und 356 pmol cAMP/mg Protein/20 min liegen die Aktivitäten unter 10^{-6} mol/l Cimetidin bzw. Ranitidin wieder unter dem Basalwert ($p<0,05$). Cimetidin und Ranitidin unterscheiden sich signifikant in ihrer Hemmwirkung der durch 10^{-7} und 10^{-5} mol/l Histamin stimulierten Adenylatzyklase ($p<0,05$).

Die parallele Rechtsverschiebung der Kurven durch beide Antagonisten spricht für einen kompetitiven Hemmechanismus. Ranitidin ist wie erwartet wieder

effektiver als Cimetidin. Die Ermittlung der K_i-Werte ergibt für Cimetidin einen Wert von 1,9 µmol/l, für Ranitidin einen Wert von 0,36 µmol/l.

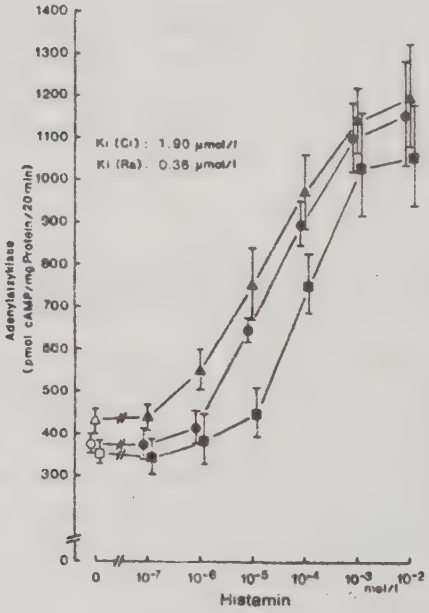


Abb. 12: Aktivierung der Adenylatzyklase (△,○,□) der Magenschleimhaut des Meerschweinchens durch 10^{-7} - 10^{-2} mol/l Histamin (▲—▲) ohne und in Gegenwart von 10^{-6} mol/l Cimetidin (●—●, Ci) oder Ranitidin (■—■, Ra)
Die Pufferkapazität des Inkubationsmediums war um das 8-fache auf 200 · 10^{-3} mol/l Tris-HCl erhöht.
N = 7, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

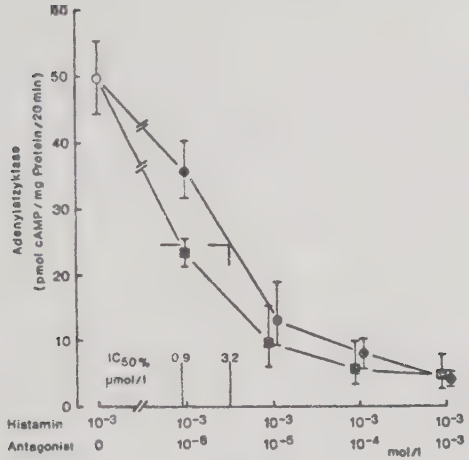


Abb. 13: Einfluß von Cimetidin (●—●) und Ranitidin (■—■) (10^{-6} - 10^{-3} mol/l) auf die mit 10^{-3} mol/l Histamin (o) stimulierte Adenylatzyklase der Magenschleimhaut des Menschen
N = 6, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.3. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit von Cimetidin und Ranitidin (Magenschleimhaut des Menschen)

3.3.1. Einfluß auf die maximal histaminstimulierte Adenylatzyklase (Abb. 13)

Die Biopsieproben aus normaler Schleimhaut wurden durch Sonifikation I homogenisiert. Die Stimulation der Adenylatzyklase durch 10^{-3}mol/l Histamin beträgt nach Abzug der Basalaktivität 50 pmol cAMP/ mg Protein/20 min. 10^{-3} mol/l Cimetidin und Ranitidin verursachen eine 90 %ige Hemmung des mit

10^{-3} mol/l Histamin stimulierten Enzyms. Ranitidin ist in der Konzentration von 10^{-6} mol/l signifikant ($p<0,05$) effektiver in seiner Hemmwirkung als Cimetidin. Bei den übrigen Konzentrationen findet sich fast kein Unterschied. Eine halbmaximale Hemmung des Histamineffektes wird entsprechend den Kurven mit ca. 0,9 µmol/l Ranitidin und 3,2 µmol/l Cimetidin erreicht.

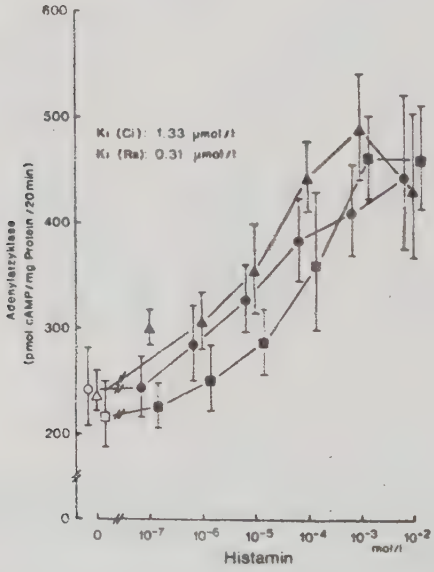


Abb. 14: Aktivierung der Adenylatzyklase (△,○,□) der Magenschleimhaut des Menschen durch 10^{-7} - 10^{-2} mol/l Histamin (▲—▲) ohne und in Gegenwart von 10^{-6} mol/l Cimetidin (●—●, Ci) oder Ranitidin (■—■, Ra)
Die Pufferkapazität des Inkubationsmediums war um das 8-fache erhöht auf $200 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tris-HCl.
N = 6, Werte: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$

3.3.2. Einfluß auf die Histamin-Konzentrationswirkungskurve (Abb. 14)

Im Unterschied zum vorhergehenden Versuch wurde das Biopsiematerial mit Homogenisation I behandelt und $200 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tris-HCl - pH 7,8 - als Inkubationsmedium verwendet, um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten.

Die parallele Rechtsverschiebung der Kurven und die Erreichung des Maximaleffekts durch 10^{-2} mol/l Histamin sprechen auch hier für einen kompetitiven Hemmechanismus beider Antagonisten. Ranitidin ist auch in menschlicher Schleimhaut wirksamer als Cimetidin; für Ranitidin wurde ein K_i-Wert von 0,31 und für Cimetidin von 1,33 µmol/l ermittelt.

3.3.3. Vergleich von Cimetidin und Ranitidin (Tab. 1)

Die anhand der histaminstimulierten Adenylatzyklase aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens und der des Menschen ermittelten IC_{50}- und K_i-Werte für Cimetidin und Ranitidin und deren Verhältnis zueinander sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die Werte lassen den Schluß zu, daß der neue H_2-Antagonist Ranitidin auf molarer Basis beim Meerschweinchen offensichtlich die histaminempfindliche Adenylatzyklase 5 - 9 mal wirksamer hemmt als Cimetidin, während er in der Magenschleimhaut des Menschen in dieser Hinsicht als ca. 4 mal potenter angesehen werden muß.

Spezies	µmol/l	Cimetidin	Ranitidin	Verhältnis
Meer-schwein-chen	$IC_{50\%}$	12	1.3	9.2
	K_I	1.94	0.27	7.2
		1.90	0.36	5.2
Mensch	$IC_{50\%}$	3.2	0.9	3.5
	K_I	1.33	0.31	4.2

Tab. 1: Halbmaximale Hemmkonzentrationen ($IC_{50\%}$) und Inhibitorkonstanten (K_i) von Cimetidin und Ranitidin
Die Werte wurden an der histaminstimulierten Adenylatzyklase aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens und Menschen ermittelt. Die erhöhte Wirksamkeit von Ranitidin auf molarer Basis ist durch den Quotienten Cimetidin zu Ranitidin ausgedrückt.

3.4. Adenylatzyklase-Aktivität in Fundus-Biopsieproben von Magengesunden und Patienten mit Magen- oder Duodenalulcus ohne und unter Cimetidin-Behandlung

3.4.1. Histamin (Abb. 15)

Die Aktivierbarkeit der Adenylatzyklase durch verschiedene Konzentrationen Histamin (10^{-6} - 10^{-3} mol/l) wurde in Biopsieproben von 1. Magengesunden, 2. Ulcuspatienten und 3. Ulcuspatienten unter Cimetidin-Behandlung (1 g/die) gemessen.

In der normalen Schleimhaut wird das Enzym maximal um 110 % durch 10^{-4} mol/l Histamin (EC_{max}) und halbmaximal durch ca. 10^{-6} mol/l (EC_{50}) aktiviert. Nicht wesentlich davon unterscheidet sich die Kurve, die im Biopsiematerial nicht behandelter Ulcuspatienten ermittelt wurde, während die "Ulcus ventriculi-Kurve" eine echte Konzentrationsabhängigkeit vermissen läßt; in dieser Gruppe ist der Histaminmaximaleffekt um 30 % reduziert. Stammen die Biopsieproben von den mit Cimetidin behandelten Patienten, dann zeigen die Kurven eine charakteristische Rechtsverschiebung im Sinne einer kompetitiven Hemmung. Die EC_{50} wird zu ca.

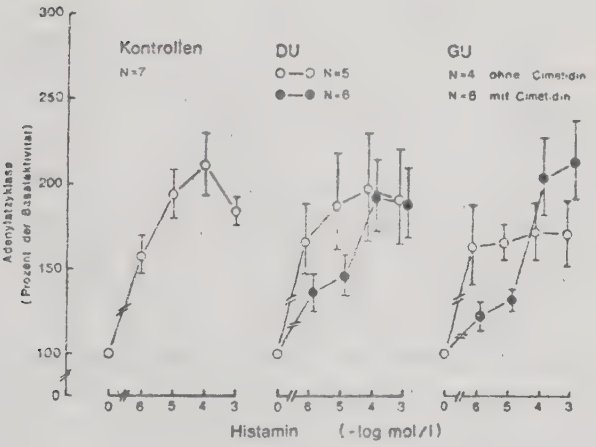


Abb. 15: Aktivierung der Adenylatzyklase aus Fundus-Biopsieproben durch 10^{-6} - 10^{-3} mol/l Histamin
Das Gewebe stammt von Kontrollen, Patienten mit Ulcus duodeni (DU) und Ulcus ventriculi (GU), die ohne oder mit Cimetidin (1 g/die) behandelt wurden (Basalaktivität = 100 %).

zehnfach höheren Histaminkonzentrationen verschoben, der Maximaleffekt wieder erreicht (Ulcus duodeni) oder sogar um 30 % überschritten (Ulcus ventriculi). In dieser Gruppe war die Wirkung von 10^{-5} mol/l Histamin durch die Cimetidin-Behandlung signifikant gehemmt ($p<0,05$).

3.4.2. Prostaglandin E_2 (Abb. 16)

Fast identische Konzentrationswirkungskurven werden im Biopsiematerial von Normalpersonen und Ulcus duodeni-Patienten gefunden. Das Enzym wird durch $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l Prostaglandin E_2 um 150 -

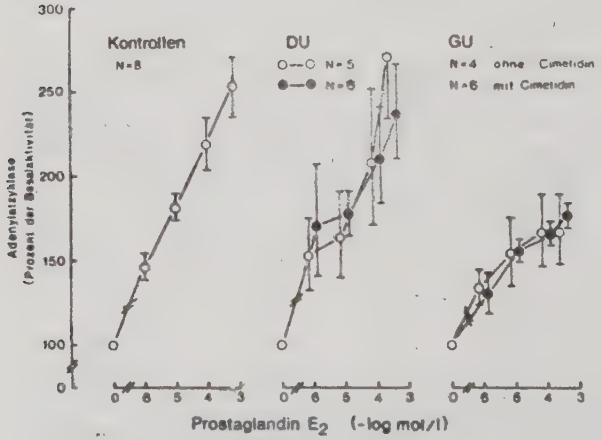


Abb. 16: Aktivierung der Adenylatzyklase aus Fundus-Biopsieproben durch 10^{-6} - $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l Prostaglandin E_2 Das Gewebe stammt von Kontrollen, Patienten mit Ulcus duodeni (DU) und Ulcus ventriculi (GU), die ohne oder mit Cimetidin (1 g/die) behandelt wurden (Basalaktivität = 100 %).

170 % stimuliert; eine maximale Aktivierung ist bei dieser Prostaglandin E_2-Konzentration möglicherweise noch nicht erreicht. Demgegenüber findet sich im Biopsiematerial der Ulcus ventriculi-Patienten eine gegenüber Prostaglandin E_2 vermindert empfindliche Adenylatzyklase, die nur zu 60 % aktiviert werden kann. Diese reduzierte Aktivierbarkeit erweist sich gegenüber den Kontrollwerten in den Konzentrationen von 10^{-4} ($p<0,05$) und $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l ($p<0,01$) als signifikant. Die Prostaglandin E_2-Wirkung auf die Adenylatzyklase aus Biopsien cimetidinbehandelter Ulcuspatienten war unverändert und entsprach völlig der Stimulierbarkeit des Enzyms von nicht behandelten Patienten.

4.3. Adrenalin (Abb. 17)

Adrenalin aktiviert die Adenylatzyklase normaler Magenschleimhaut maximal um 90 %, und dieser Effekt wird durch 10^{-4} - 10^{-3} mol/l erreicht. Im Vergleich dazu zeigt die Kurve der Adenylatzyklase-Aktivierung aus der Schleimhaut der Ulcus ventriculi-Patienten keine faßbare Veränderung, während die der Ulcus duodeni-Patienten eine veränderte Form mit einem Plateau aufweist. Der Maximaleffekt von 150 % wird in dieser Gruppe bereits mit 10^{-5} mol/l Adrenalin erreicht. Cimetidin-Behandlung der Patienten beeinflußt offensichtlich die Adrenalinwirkung auf die Adenylatzyklase. Jedoch kommt es, und dies steht im Gegensatz zur Aktivierung durch Histamin, nicht zu einer Verschiebung der Konzentrationswirkungskurven nach rechts, d. h. die EC_{50} wird nicht verändert. Vielmehr tritt unter

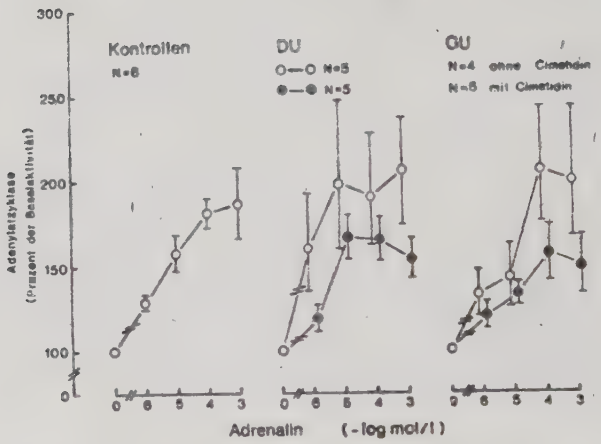


Abb. 17: Aktivierung der Adenylatzyklase aus Fundus-Biopsieproben durch 10^{-6} - 10^{-3} mol/l Adrenalin
Das Gewebe stammt von Kontrollen, Patienten mit Ulcus duodeni (DU) und Ulcus ventriculi (GU), die ohne oder mit Cimetidin (1 g/die) behandelt wurden (Basalaktivität = 100 %).

der Therapie mit dem Histamin-H_2-Antagonisten eine Reduktion der Adrenalinaktivierbarkeit des Enzyms in allen, auch den maximal wirkenden Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-3} mol/l, auf. Dies spricht für eine inhibitorische Beeinflussung des Adrenalineffektes durch Cimetidin im Sinne eines nicht kompetitiven Hemmechanismus.

4. DISKUSSION

4.1. Untersuchungen zur Methodik

Die Adenylatzyklase ist ein Enzymsystem mit besonderen Eigenschaften: Sie ist in die Plasmamembran der Zelle eingebaut; im löslichen Oberstand eines Gewebehomogenats ist keine Aktivität nachweisbar (Davoren and Sutherland, 1963). Sie wird in vivo über spezifische Rezeptoren durch Hormone, Gewebshormone und Neurotransmitter stimuliert und kann in vitro durch Substanzen wie NaF, möglicherweise an der Stelle, wo die cAMP-Synthese abläuft, d. h. an der katalytischen Einheit aktiviert werden (Birnbaumer et al., 1971; Drummond et al., 1971). Diese Eigenschaften machen es verständlich, daß Verfahren, die das Gewebe zerkleinern, die Zellen aufbrechen und damit die Plasmamembran schädigen, das Enzym und seine Aktivität beeinträchtigen können. Durch eine Destruktion können nicht nur die Untereinheiten des Enzyms, wie z. B. die katalytische Einheit, sondern auch die Struktur des Hormonrezeptors Schaden nehmen.

Achar et al. (1977) untersuchten die Adenylatzyklase-Aktivität von Fibroblastenkulturen, Monozyten, Lymphozyten, Herzzellen und Parietalzellen, die mittels Sonifikation aufgeschlossen worden waren. Mit diesem Verfahren erhielten sie höhere basale, hormon- und NaF-abhängige Adenylatzyklase-Aktivitäten, als wenn sie die Zellen in herkömmlicher Weise homogenisierten. Dieses Ergebnis und um ein besser reproduzierbares Verfahren in die Hand zu bekommen, waren der Grund, weshalb diese Methode auch für die Adenylatzyklase der Magenschleimhaut überprüft wurde.

Wie die Ergebnisse jedoch zeigen, können die Befunde von Achar et al. (1977) nicht bestätigt werden. Die absoluten cAMP-Syntheseraten, sowohl basal als auch hormonell- oder NaF-stimuliert, waren nach herkömmlicher Homogenisation mit einem Glas-Teflon-Homogenisator höher als nach Beschallung. Für eine Erklärung dieses konträren Sachverhalts können folgende Gründe aufgeführt werden: 1. Achar et al. benutzten isolierte Zellen, während dagegen in dieser Arbeit ein intakter Gewebeverband als Ausgangsmaterial vorlag, und 2. arbeiteten sie mit einer speziellen Mikrosonde, mit der geringere Beschallungsintensitäten abgegeben werden konnten. Eine solche Sonde stand bei den eigenen Versuchen jedoch nicht zur Verfügung.

Obwohl die absoluten Aktivitäten bei der in unserem Falle angewandten Beschallungstechnik geringer waren, erwies sich dieses Verfahren, d. h. Sonifikation I, für die Schleimhaut des Meerschweinchens als günstiger. Die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase war ausreichend erhalten, die Streuung der Ergebnisse nach Anwendung dieses Verfahrens geringer und damit eine bessere Reproduzierbarkeit gegeben. Die Ursache für die geringe Schwankung der Enzymaktivitäten geht auf die stärkere und homogenere Gewebezerkleinerung zurück. Nach Homogenisation I erhält man ein grob partikuläres Homogenat mit größeren Membranfragmenten. Die höhere Streuung rührt wahrscheinlich daher, daß nicht zerkleinerte Gewebebrocken beim Pipettieren des Enzyms einen Fehler mit sich bringen.

Ein weiterer Grund, der dafür sprach, Sonifikation I anzuwenden, bestand darin, daß die Histamin-Rezeptor-Spezifität bei Anwendung dieses Verfahrens besser gewährleistet erschien: Mepyramin, der Histamin-H_1-Rezeptor-Antagonist, zeigte praktisch keine Wirkung, während der Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonist Cimetidin

die histaminstimulierte Adenylatzyklase signifikant hemmt. Dieser Punkt hatte insofern Bedeutung, da die histaminempfindliche Adenylatzyklase, wie man heute weiß, ausschließlich über Histamin-H_2-Rezeptoren aktiviert wird.

In der Vergangenheit wurden dazu kontroverse Daten veröffentlicht; wahrscheinlich deshalb, weil unterschiedliche Homogenisationstechniken verwandt wurden und der Hormonrezeptor geschädigt wurde.
Karppanen et al. (1974) zeigten, daß im nicht homogenisierten Gewebe, d. h. in intakten Schleimhautpartikeln des Meerschweinchenfundus, der H_2-Rezeptor-Antagonist Burimamid ein potenter Hemmstoff der durch Histamin angeregten intrazellulären cAMP-Bildung war, während der H_1-Rezeptor-Antagonist Diphenhydramin keine Wirkung zeigte. Antilla et al. (1976) berichteten dagegen, daß die zellfreie Adenylatzyklase der Magenschleimhaut dieser Spezies im gleichen Ausmaß durch H_1- und H_2-Rezeptor-Antagonisten gehemmt wird. Diese Ergebnisse wurden durch Thompson und Jacobson (1977) und durch Perrier und Griessen (1976) bestätigt. Die letzteren Autoren demonstrierten sogar für beide Antagonisten einen kompetitiven Hemmechanismus. In einer methodischen Untersuchung von Ruoff (1978), ebenfalls in der Meerschweinchenmagenschleimhaut, wurde dann jedoch gezeigt, daß es während der Enzympräparation durch mechanische Einflüsse zu einem Verlust der H_2-Rezeptor-Spezifität kommen kann, so daß das Enzym gegenüber H_1- und H_2-Rezeptor-Antagonisten gleich empfindlich reagiert.

Demnach ist die Homogenisation des Gewebes eine Schwachstelle bei der Präparation des Enzyms, und man muß Kompromisse eingehen. Dies zeigte sich auch im Falle der Bearbeitung der menschlichen Schleimhaut. Die Adenylatzyklase aus diesem Gewebe ist wesentlich weni-

ger histaminempfindlich, und die absoluten Aktivitäten wie auch die Stimulierbarkeit nahmen unter Sonifikation zu stark ab, so daß das Biopsiematerial vorsichtig mit der Hand homogenisiert wurde.

Weitere Voraussetzungen für die Messung der Adenylatzyklase sind eine zeitlineare Reaktion, gekennzeichnet durch eine konstante cAMP-Syntheserate, die nur durch einen konstanten Substratspiegel aufrechterhalten werden kann. Diese Bedingungen waren sowohl bei der Bestimmung der basalen Adenylatzyklase-Aktivität als auch unter 6-facher Stimulation mit 10^{-3} mol/l Histamin gegeben.

Besonders wichtig für die Arbeit mit menschlichem Biopsiematerial, von dem bisweilen weniger als 1 mg zur Verfügung steht, ist der Einsatz geringer Gewebemengen, die aber noch eine Meßbarkeit des Enzyms erlauben müssen. Mit 50 - 200 µg kann die Adenylatzyklase-Aktivität bestimmt werden; und es besteht, ebenfalls eine Voraussetzung für den Test, auch eine lineare Beziehung zwischen der jeweiligen Proteinmenge und der gebildeten cAMP-Menge.

Ein weiterer Faktor, der für die Adenylatzyklase der Magenschleimhaut überprüft wurde, ist das pH-Optimum des Enzyms, welches bei einem pH von 7,8 liegt. Bei diesem pH-Wert wird die höchste basale, histamin- und NaF-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität gemessen. Das gleiche Optimum wurde auch schon für Adenylatzyklasen aus anderen Geweben gefunden, so durch Wikström und Ågren (1973) in Ehrlichschen-Tumor-Zellen und in vielen anderen normalen Geweben durch Rosen und Rosen (1969), Vaughan und Murad (1969), Ray et al. (1970), Hynie und Sharp (1971) und Kelly und Koritz (1971).

GTP gilt als notwendiger Cofaktor der hormonellen Aktivierung der Adenylatzyklase. Demgegenüber zeigen die Ergebnisse, daß exogenes GTP die Stimulation der Magenschleimhaut-Adenylatzyklase durch Histamin nicht steigert, sondern hemmt. Daraus kann nicht geschlossen werden, daß GTP für die Aktivierung nicht notwendig wäre, da der endogene GTP-Spiegel und das Optimum für die GTP-Konzentration nicht bekannt ist. Auf jeden Fall stören höhere Konzentrationen die Aktivierung in der menschlichen Schleimhaut. Ähnliche Befunde zeigten auch Schafer et al. (1978) in der Fundusschleimhaut des Kaninchens.

3.2. Inhibitorische Wirksamkeit von Ranitidin und Cimetidin

Ranitidin, Cimetidin und in höheren Konzentrationen Mepyramin hemmen die Basalaktivität. Die Ursache dafür kann zum einen darin gesehen werden, daß durch den Homogenisationsprozeß endogenes Histamin freigesetzt wird, dessen stimulierender Effekt durch die Histamin-Antagonisten gehemmt wird. Diese Vermutung geht auf eine Beobachtung von Ruoff und Sewing (1976) zurück, die in der Magenschleimhaut des Hundes eine endogene Histaminstimulation der Adenylatzyklase nachweisen konnten. Zum andern kann aber eine unspezifische Hemmwirkung, jedenfalls in höheren Konzentrationen, auf die Basalaktivität nicht ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die inhibitorische Wirksamkeit von Ranitidin und Cimetidin an der histaminstimulierten Adenylatzyklase der Magenschleimhaut, um zu einer Beurteilung der molaren Wirksamkeit dieser neuen Substanz im Vergleich zu dem anerkannten, bereits in die Therapie eingeführten Histamin-H_2-Antagonisten Cimetidin zu kommen.

Für diesen Vergleich bot sich die über Histamin-H_2-Rezeptoren aktivierbare Adenylatzyklase der Magenschleimhaut als einfaches, subzelluläres In-vitro-Test-System an. Histamin-H_2-Antagonisten konnten nämlich bisher nur am Ganztier oder an isolierten Organen, d. h. Herz, Magen und Uterus, ausgetestet werden. Wie die Erfahrung jedoch gezeigt hat, ist auch dieses System nicht problemlos. Die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Histamin kann mit Konzentrationen von 10^{-7} mol/l initiiert werden; maximale Effekte erreicht man jedoch erst mit 10.000 - 100.000 mal höheren Konzentrationen. Dies bedeutet, daß man es mit einer extrem flachen Konzentrationswirkungskurve zu tun hat, was besondere Schwierigkeiten aufwirft:

1. Um die Dissoziationskonstante und den Hemmtyp eines Antagonisten nach dem von Schild (1947) empfohlenen Verfahren zu bestimmen, wäre es erforderlich, Konzentrationswirkungskurven ohne und in Anwesenheit verschiedener Antagonisten-Konzentrationen durchzuführen. Dies ist aber unter den gegebenen Umständen technisch nicht möglich und physiologisch nicht mehr vertretbar, da dazu Histaminkonzentrationen in der Größenordnung von mehr als 10^{-2} mol/l nötig wären.
2. Derartig flache Kurven können nicht mit den üblichen Verfahren der linearen Transformation (Lineweaver and Burk, 1934; Eadie 1942,1952; Hofstee, 1952), die der Ermittlung der EC_{50} und des Maximaleffekts (E_{max}) dienen, bearbeitet werden. Die Konzentrationsunterschiede zur Aktivierung des Enzyms (1:10.000) sind zu groß. Deshalb wurde auf dieses Verfahren verzichtet und der max. Effekt aus der Histamin-Konzentrationswirkungskurve direkt abgelesen und mit diesem Wert die jeweilige EC_{50} bestimmt. Die Dissoziationskonstante der Antagonisten wurde dann mit der in der Methodik angegebenen Gleichung berechnet.

Die Ergebnisse, die auf diesem Weg erhalten wurden, zeigen, daß Ranitidin in der Magenschleimhaut des Meerschweinchens auf molarer Basis 5 - 9 mal und in der menschlichen Magenschleimhaut ca. 4 mal effektiver die histaminstimulierte Adenylatzyklase hemmt als Cimetidin. Die K_i-Werte, die für Ranitidin und Cimetidin berechnet wurden (siehe Tab. 1), liegen bei etwas höheren Konzentrationen als die vom Hersteller angegebenen Werte, die am isolierten Uterus der Ratte und isolierten Herz des Meerschweinchens ermittelt wurden: Ranitidin $6{,}5 \cdot 10^{-8}$ mol/l (Uterus) und $6{,}8 \cdot 10^{-8}$ mol/l (Herz) und Cimetidin $6{,}6 \cdot 10^{-7}$ mol/l (Uterus) und $2{,}8 \cdot 10^{-7}$ mol/l (Herz).

Eine einleuchtende Erklärung für diese Unterschiede bietet sich nicht an. Möglicherweise ist jedoch die Adenylatzyklase ein System, das durch die Methodik unempfindlicher geworden ist und nicht mehr ganz die physiologischen Verhältnisse repräsentiert.

Vergleichende Untersuchungen zwischen Ranitidin und Cimetidin auf die Magensäuresekretion des Menschen liegen bis jetzt erst wenige vor. Domschke et al. (1979) fanden nach parenteraler Applikation, daß Ranitidin 4 mal wirksamer als Cimetidin die pentagastrinstimulierte Magensäuresekretion hemmt. Jedoch wurde in dieser Untersuchung nur eine Konzentration von Cimetidin getestet, so daß eine definitive Aussage über die Wirksamkeit von Cimetidin nicht möglich ist. Hagenmüller et al. (1979) verglichen nach parenteraler Applikation die Hemmung der Magensäuresekretion durch Ranitidin und Cimetidin. 40 mg Ranitidin hemmen die Magensäuresekretion gleich stark wie 200 mg Cimetidin. Da supramaximale Dosen zur Hemmung der Säuresekretion verwandt wurden, geht auch aus dieser Untersuchung das wahre Wirkverhältnis nicht genau hervor. Simon und Kather (1979) konnten anhand von Dosiswirkungsbezie-

hungen zeigen, daß Ranitidin nach oraler Gabe dosisabhängig die pentagastrinstimulierte Säuresekretion hemmt. Ranitidin ist doppelt so wirksam wie Cimetidin, und die Autoren behaupten, daß Ranitidin einen deutlich längeren antisekretorischen Effekt hat. Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Obereinstimmung der Hemmwirkung von Cimetidin zu Ranitidin auf die Magensäuresekretion und Adenylatzyklase-Aktivität des Menschen. Ober die Hemmung der Säuresekretion des Meerschweinchens durch Ranitidin und Cimetidin liegen z. Z. noch keine Daten vor.

Betrachtungen über chemische Unterschiede zwischen beiden Antagonisten, auf welche die unterschiedliche Wirksamkeit zurückzuführen ist, bieten sich an. Während der Imidazolring bis vor kurzem als notwendiges Strukturmerkmal eines Histamin-H_2-Antagonisten galt (Ganellin et al., 1976; Brimblecombe et al., 1978), muß diese Annahme durch Ranitidin mit seinem substituierten Aminoalkyl-Furanring eingeschränkt werden. Die Konfiguration hat eine spezifische und hohe Affinität für H_2-Rezeptoren. Der Furanring des Ranitidin ist jedoch nicht die Ursache für die stärkere Wirkung dieser Substanz. Dies kann gezeigt werden, wenn die Seitenkette von Ranitidin durch die von Cimetidin substituiert wird. Diese Substanz hat nämlich die gleiche Potenz wie Cimetidin (Firmenmitteilung Glaxo, 1979). Der Unterschied der Wirksamkeit scheint daher an die Seitenkette gebunden zu sein. Beim Cimetidin wird durch Einbau von Elektronen-Akzeptoren die Basizität des Guanidins herabgesetzt und die ungeladene Form begünstigt; Ranitidin enthält anstelle der Cyanimino-Gruppe (= N -CN) eine Nitromethyliden-Gruppe (= CH - NO_2) und damit eine geringere Basizität.

4.3. Adenylatzyklase in der Schleimhaut von Magengesunden und Patienten mit peptischem Ulcus

In der Fundusschleimhaut des Magens findet sich neben der histaminempfindlichen Adenylatzyklase auch ein Enzym, das auf Adrenalin und Prostaglandin E_2 anspricht, d. h. auf Substanzen, die mit dem Prozeß der Stimulation der Säuresekretion nicht unmittelbar in Verbindung stehen.

Histamin:
Untersuchungen mit isolierten und angereicherten Parietalzellfraktionen (Soll and Wollin, 1977; Sonnenberg et al., 1978) und mit Biopsiematerial aus der menschlichen Magenschleimhaut (Ruoff et al., 1979 a u. b) haben charakteristische Eigenschaften der histaminempfindlichen Adenylatzyklase der Magenschleimhaut aufgezeigt.

1. Das Enzym kommt ausschließlich im Magenfundus, dem säuresezernierenden Teil des Magens vor; im Antrum läßt sich keine Aktivität mehr nachweisen.
2. Die Aktivierbarkeit ist vom jeweiligen Parietalzellgehalt abhängig. Dies läßt sich sowohl an isolierten und angereicherten Parietalzellfraktionen als auch mit Biopsiematerial von Patienten mit zunehmender Schleimhautatrophie nachweisen.
3. Histamin aktiviert die Adenylatzyklase und stimuliert die Säuresekretion über H_2-Rezeptoren.

Diese Befunde unterstützen die Annahme, daß die Aktivierung der Adenylatzyklase ein wichtiger Schritt im Ablauf der Stimulation der Säuresekretion ist.

Das Duodenalulcus ist eine Erkrankung, die mit einer erhöhten Säuresekretion einhergeht (Baron, 1970; Sun and Roth, 1974; Petersen and Myren, 1975). Ursache

dieser vermehrten Produktion von Salzsäure soll eine erhöhte Parietalzellzahl sein (Card and Marks, 1960; Schmidt et al., 1972; Wormsley, 1974). Außerdem gibt es Hinweise, daß Patienten mit dieser Erkrankung auf säuresekretorische Reize empfindlicher ansprechen (Fordtran and Walsh, 1973; Petersen and Myren, 1975; Isenberg et al., 1975). Im Zusammenhang mit den oben geschilderten Befunden über die histaminempfindliche Adenylatzyklase wäre es deshalb denkbar, daß im Biopsiematerial von diesen Patienten Veränderungen der Enzymaktivierung im Sinne einer Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurve und einer stärkeren Aktivierbarkeit (Zunahme von E_{max}) auftreten. Das ist nach den vorliegenden Untersuchungen nicht so. Signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen konnten nicht ermittelt werden. Um einen derartigen Sachverhalt nachzuweisen, wird wahrscheinlich ein wesentlich größeres Untersuchungsgut benötigt. Was das Ulcus ventriculi betrifft, so war die Konzentrationswirkungskurve aus dem Biopsiematerial dieser Krankheitsgruppe merkwürdig verformt. Eine Erklärung dieses Phänomens im Bezug zur Pathophysiologie dieser Erkrankung ist nicht greifbar. Bei diesen Versuchen kommt jedoch der therapeutische Einfluß der Behandlung mit Cimetidin klar zum Ausdruck. Bei einer üblichen Einzeldosis von 200 mg Cimetidin wurde bei einem mittleren Gewicht von 70 kg ein Plasmaspiegel von ca. 1 mg/l gemessen (Sewing et al., 1978). Dies entspricht einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß es entsprechend den In-vitro-Versuchen zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurven kommt.

Prostaglandin E_2:
Diese Substanz ist durch eine cytoprotektive Wirkung an der Magenschleimhaut und eine Hemmung der Säuresekretion gekennzeichnet (Way and Durbin, 1969; Main and Whittle, 1974). Ob diese Effekte über das Adenylat-

zyklase-cAMP-System gesteuert werden, ist Gegenstand der gegenwärtigen Forschung. Prostaglandin E_2 ist ein potenter Aktivator der Adenylatzyklase aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens (Perrier and Laster, 1970; Wollin et al., 1976) und der des Menschen (Simon and Kather, 1978). Im Gegensatz zur histaminempfindlichen Adenylatzyklase ist dieses Enzym jedoch nicht in den Parietalzellen, sondern in anderen Zelltypen der Schleimhaut, möglicherweise den schleimproduzierenden Zellen, lokalisiert. Dafür sprechen verschiedene Befunde:

1. Die prostaglandinempfindliche Adenylatzyklase kommt nicht nur im Magenfundus, sondern auch im Antrum vor.
2. Der maximale Effekt der Adenylatzyklase-Aktivierung durch Prostaglandin und Histamin ist additiv (Wollin et al., 1976).
3. Der Prostaglandin-Antagonist Polyphloretinphosphat hemmt nur die prostaglandin- und nicht die histaminstimulierte Adenylatzyklase (Dousa and Dozois,1977).
4. In Zellfraktionen mit angereicherten Parietalzellen nimmt der Grad der Aktivierung der Adenylatzyklase durch Prostaglandin E mit zunehmender Zahl der Parietalzellen ab (Sonnenberg et al., 1978).

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, hat die Behandlung der Patienten mit Cimetidin überhaupt keinen Einfluß auf die prostaglandinstimulierte Adenylatzyklase. Dieser Befund stimmt mit den gerade angeführten Daten der Literatur überein und spricht ebenfalls dafür, daß es sich bei der histamin- und prostaglandinstimulierten Adenylatzyklase um zwei verschiedene Systeme handelt.

Die Aktivierbarkeit der prostaglandinempfindlichen Adenylatzyklase aus dem Biopsiematerial von Patienten mit Magenulcus war verglichen mit der der Kontrollen und Duodenalulcera signifikant reduziert.

Das Magenulcus ist im Gegensatz zum Duodenalulcus eine Erkrankung, die nicht mit einer erhöhten Säuresekretion einhergeht (Ricketts et al., 1949; Baron, 1970; Marcussen et al., 1970; Isenberg et al., 1971; Stadelmann et al., 1971). In der Pathogenese steht damit die Säure als aggressiver Faktor nicht so sehr im Vordergrund, vielmehr wird das Gleichgewicht auf seiten der protektiven Faktoren, etwa durch eine funktionelle Störung der Schleimhaut, verändert und als Ursache der Auslösung dieser Erkrankung diskutiert. Wie schon erwähnt, besitzt Prostaglandin E eine cytoprotektive Wirkung. Es kann z. B. die Entstehung von Ulcera durch nicht-steroidale Pharmaka im Tierexperiment verhindern (Kauffman et al., 1979). Ob die Adenylatzyklase bei der Vermittlung des cytoprotektiven Effekts beteiligt ist, weiß man noch nicht; doch könnten die hier vorgelegten Befunde über die verringerte Aktivierbarkeit der Adenylatzyklase durch Prostaglandin E_2 in der Magenschleimhaut von Ulcus ventriculi-Patienten in diesem Sinne gedeutet werden.

Adrenalin:
1967 postulierten Robison et al., daß generell alle Effekte, die durch eine adrenerge ß-Rezeptorenstimulation ausgelöst werden, an eine Aktivierung der Adenylatzyklase gebunden sind. Diese Behauptung wurde an verschiedenen Geweben bestätigt (Walaas and Walaas, 1970; Kukovetz et al., 1973).

Auch die Magenmucosa, obwohl sie kein typisches Zielorgan für Katecholamine ist, wurde in dieser Hinsicht untersucht. So führte i.p.injiziertes Adrenalin in

der Schleimhaut der Ratte über eine ß-Rezeptoren-Stimulation zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg (Ruoff, 1977).

Ergebnisse mit der menschlichen Magenschleimhaut zeigten, daß Adrenalin nicht nur die Adenylatzyklase der Fundusschleimhaut, sondern auch die des Antrums aktiviert (Ruoff et al., 1977). Ebenfalls in menschlicher Schleimhaut stimulierten Simon und Kather (1977) eine in gleichem Maße gegen Adrenalin und das ß-Sympathomimetikum Isoproterenol empfindliche Adenylatzyklase, die durch den ß-Rezeptorenblocker Propranolol hemmbar war. An einer adrenalinempfindlichen Adenylatzyklase, die über ß-Rezeptoren aktiviert werden kann, besteht somit auch in der Magenschleimhaut kein Zweifel, während über die Funktion sowohl der Katecholamine als auch dieses Systems so gut wie nichts bekannt ist.

Was die eigenen Versuche angeht, so ist besonders von Interesse, daß die durch Adrenalin stimulierte Adenylatzyklase mit Cimetidin gehemmt wird. Cimetidin als spezifischer kompetitiver Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonist scheint unter therapeutischen Bedingungen auch einen allerdings nicht kompetitiven inhibitorischen Effekt auf die Adrenalinstimulation auszuüben. Ob diese Eigenschaft des Cimetidins in irgendeiner Weise mit der therapeutischen Wirksamkeit dieses Stoffes zu tun hat, ist nicht bekannt. Ebenfalls nur als ein Hinweis kann die höhere Empfindlichkeit der Adenylatzyklase aus dem Biopsiematerial von Patienten mit Duodenalulcera gegen Adrenalin gewertet werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Basierend auf methodischen Studien über die Bestimmung der Aktivität der Adenylatzyklase aus der Magenschleimhaut des Meerschweinchens und Menschen wird unter Anwendung dieses Tests die molare Wirksamkeit von Ranitidin, einem neuen Histamin-H_2-Rezeptor-Antagonisten, im Vergleich zu Cimetidin untersucht. In einem weiteren Teil wird außerdem die Adenylatzyklase aus normalen Magenfundus-Biopsieproben und solchen von Patienten mit Ulcus duodeni oder ventriculi untersucht.

Im Vergleich mit einer mechanischen Homogenisationsmethode erwies sich Beschallung der Magenschleimhaut des Meerschweinchens als ein brauchbares Verfahren für die Enzympräparation. Für die menschliche Schleimhaut war Beschallung weniger geeignet.
Das pH-Optimum der Adenylatzyklase aus der Magenschleimhaut entspricht dem anderer Gewebe und liegt bei pH 7,8.
Zusatz von GTP (10^{-7} - 10^{-3} mol/l) erhöht konzentrationsabhängig die basale Adenylatzyklase-Aktivität und verringert die Stimulierbarkeit durch Histamin.

Die maximal durch 10^{-3} mol/l Histamin aktivierte Adenylatzyklase vom Meerschweinchen wird durch 12 µmol/l Cimetidin und 1,3 µmol/l Ranitidin zu 50 % gehemmt. Die entsprechenden Werte in der menschlichen Schleimhaut betragen 3,2 und 0,9 µmol/l. Anhand von Histamin-Konzentrationswirkungskurven werden die K_i-Werte ermittelt, die in der Meerschweinchenschleimhaut für Cimetidin und Ranitidin 1,92 und 0,32 µmol/l und in der menschlichen Schleimhaut 1,33 und 0,31 µmol/l betragen. Dies läßt den Schluß zu, daß Ranitidin auf molarer Basis die histaminstimulierte Adenylatzyklase des Meer-

schweinchens 5 - 9 mal und die des Menschen ca. 4 mal wirksamer als Cimetidin hemmt.

Die Ermittlung von Konzentrationswirkungskurven der Adenylatzyklase-Aktivierung mit Histamin, Prostaglandin E_2 und Adrenalin in normalen Fundus-Biopsieproben und solchen von Patienten mit Duodenal- oder Magenulcera zeigt, daß die Prostaglandin E_2-Aktivierung beim Magenulcus drastisch reduziert ist. Entstammen die Biopsieproben von Patienten, die unter Cimetidin-Therapie stehen, so ist der Histamineffekt auf die Adenylatzyklase kompetitiv und der Adrenalineffekt nicht kompetitiv gehemmt, während die Prostaglandin E_2-Aktivierung überhaupt nicht beeinflußt wird. Diese Befunde zeigen, daß die funktionelle Rolle der Adenylatzyklase in der Magenschleimhaut bei der Ulcuskrankheit möglicherweise gestört ist, und daß die Cimetidin-Therapie an diesem System angreift.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ACHAR, S. B., STRADA, S. J., SANDERS, R. B., PLEDGER, W. J., THOMPSON, W. J., ROBISON, G. A.:
Sonication as a tool for the study of adenylyl cyclase activity.
J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 189-198 (1977)

ALONSO, D., HARRIS, J. B.:
Effect of xanthines and histamine on ion transport and respiration by frog gastric mucosa.
Am. J. Physiol. 208, 18-23 (1965)

ANTILLA, P., LOCKE, C., WESTERMANN, E.:
Stimulation of adenylate cyclase of guinea pig gastric mucosa by histamine, sodium fluoride and 5'-guanylylimidodiphosphate and inhibition by histamine H_1- and H_2-receptor antagonists in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 269, 31-36 (1976)

ASH, A. S. F., SCHILD, H. O.:
Receptors mediating some actions of histamine.
Brit. J. Pharmacol. Chemother. 27, 427-439 (1966)

BARON, J. H.:
The clinical use of gastric function test.
Scand. J. Gastroent. Suppl. 6, 9 (1970)

BIRNBAUMER, L., POHL, S. L., RODBELL, M.:
The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. II. Comparison between glucagon- and fluoride-stimulated activities.
J. Biol. Chem. 246, 1857-1860 (1971)

BLACK, J. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, G. J., GANELLIN, C. R., PARSONS, M. E.:
Definition and antagonism of histamine H_2-receptors.
Nature 236, 385-390 (1972)

BLACK, J. W., DUNCAN, W. A. M., EMMETT, J. C., GANELLIN, C. R., HESSELBO, T., PARSONS, M. E., WYLLIE, J. H.:
Metiamide – an orally active histamine H_2-receptor antagonist.
Agents and Actions 3, 133-137 (1973)

BRIMBLECOMBE, R. W., DUNCAN, W. A. M., DURANT, G. J., EMMETT, J. C., GANELLIN, C. R., LESLIE, G. B., PARSONS, M. E.:
Characterization and development of cimetidine as a histamine H_2-receptor antagonist.
Gastroenterology 74, 339-347 (1978)

BUTCHER, R. W., SUTHERLAND, E. W.:
Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3', 5'-phosphate in human urine.
J. Biol. Chem. 237, 1244-1250 (1962)

CARD, W. I., MARKS, I. N.:
The relationship between the acid output of the stomach following "maximal" histamine stimulation and the parietal cell mass.
Clin. Sci. 19, 147-163 (1960)

DAVOREN, P. R., SUTHERLAND, E. W.:
Cellular location of adenyl cyclase in the pigeon erythrocyte.
J. Biol. Chem. 238, 3016 (1963)

DOMSCHKE, W., LUX, G., DOMSCHKE, S.:
Gastric inhibitory action of H_2-antagonists ranitidine and cimetidine.
Lancet I, 320 (1979)

DOUSA, T. P., DOZOIS, R. R.:
Interrelationships between histamine, prostaglandins, and cyclic AMP in gastric secretion: a hypothesis.
Gastroenterology 73, 904-912 (1977)

DRUMMOND, G. I., SEVERSON, D. L., DUNCAN, L.:
Adenyl cyclase: kinetic properties and nature of fluoride and hormone stimulation.
J. Biol. Chem. 246, 4166-4173 (1971)

GADIE, G. S.:
The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine.
J. Biol. Chem. 146, 85-93 (1942)

GADIE, G. S.:
On the evaluation of the constants V_m and K_M in enzyme reactions.
Science (N.Y.) 116, 688 (1952)

GISCHER, E. H., HURD, S. S., KOH, P., SEERY, V. L., TELLER, D. C.:
Control of glycogen metabolism. FEBS Proc. 4th Meeting, Oslo 1967.
Academic Press, New York, 19 (1968)

GRDTRAN, J. S., WALSH, J. H.:
Gastric acid secretion rate and buffer content of the stomach after eating; results in normal subjects and in patients with duodenal ulcer.
J. Clin. Invest. 52, 645 (1973)

FORREST, J. A. H., SHEARMAN, D. J. C., SPENCE, R., CELESTIN, L. R.:
Neutropenia associated with metiamide.
Lancet I, 392-393 (1975)

GANELLIN, C. R., DURANT, G. J., EMMETT, J. C.:
Some chemical aspects of histamine H_2-receptor antagonists.
Fed. Proc. 35, 1924-1930 (1976)

GILMAN, A. G.:
A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 305-312 (1970)

HAGENMOLLER, F., ZEITLER-ABU-ISHIRA, A., CLASSEN, M.:
Hemmung der Magensäuresekretion durch den Histamin H_2-Rezeptorantagonisten AH 19065 (Ranitidine) im Vergleich zu Cimetidine - eine Doppelblindstudie.
Z. Gastroenterol. 17, 583 (1979)

HARRIS, J. B., NIGON, K., ALONSO, D.:
Adenosine-3', 5'-monophosphate: intracellular mediator for methyl xanthine stimulation of gastric secretion.
Gastroenterology 57, 377-384 (1969)

HOFSTEE, B. H. J.:
On the evaluation of the constants V_m and K_M in enzyme reactions.
Science (N.Y.) 116, 329-331 (1952)

HYNIE, S., SHARP, W. G.:
Adenyl cyclase in toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta 230, 40-51 (1971)

ISENBERG, J. I., SPECTOR, H., HOOTKIN, L. A., PITCHER, J. L.:
An apparent exception to Schwarz's dictum, "no acid - no ulcer".
New. Engl. J. Med. 286, 620 (1971)

ISENBERG, J. I., GROSSMAN, M. I., MAXWELL, V., WALSH, J. H.:
Increased sensitivity to stimulation of acid secretion by pentagastrin in duodenal ulcer.
J. Clin. Invest. 55, 330 (1975)

JACOBSON, E. C., THOMPSON, W. J.:
Cyclic AMP and gastric secretion: the illusive second messenger.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 7, 199-230 (1976)

KARPPANEN, H. O., NEUVONEN, P. J., BLECK, P. R., WESTERMANN, E.:
Effect of histamine, pentagastrin and theophylline on the production of cyclic AMP in isolated gastric tissue of the guinea pig.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, 15-23 (1974)

KAUFFMANN, Jr., G. L., FOLEY, K. T., GROSSMAN, M. I.:
Cimetidine does not inhibit indomethacin-induced small bowel ulceration in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161, 512-514 (1979)

KELLY, L. A., KORITZ, S. B.:
Bovine adrenal cortical adenyl cyclase and its stimulation by adrenocorticotropic hormone and NaF.
Biochim. Biophys. Acta 237, 141-155 (1971)

KIMBERG, D. V.:
Cyclic nucleotides and their role in gastrointestinal secretion.
Gastroenterology 67, 1023-1064 (1974)

KUKOVETZ, W. R., PÖCH, G., WURM, A.:
Effect of catecholamines, histamine and oxyfedrine on isotonic contraction and cyclic AMP in the guinea-pig heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 403-424 (1973)

LINEWEAVER, H. BURK, D.:
The determination of enzyme dissociation constants.
J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, J. J., FARR, A. L., RANDALL, R.J.:
Protein measurements with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MAIN, I. H. M., WHITTLE, B. J. R.:
Prostaglandin E_2 and the stimulation of rat gastric acid secretion by dibutyryl cyclic 3', 5'-AMP.
Europ. J. Pharmacol. 26, 204-211 (1974)

MARCUSSEN, H., WULFF, H. R., WULFF, M. R.:
Evaluation of acid secretion in gastric ulcer.
A combined radiological and secretory study.
Scand. J. Gastroent. 5, 65 (1970)

MIYAMOTO, E., KUO, J. F., GREENGARD, P.:
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
III. Purification and properties of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain.
J. Biol. Chem. 244, 6395-6402 (1969)

PERRIER, C. V., LASTER, L.:
Adenylate cyclase activity of guinea pig gastric mucosa: stimulation by histamine and prostaglandins.
J. Clin. Invest. 49, 73a (1970)

PERRIER, C. V., GRIESSEN, M.:
Action of H_1 and H_2 inhibitors on the response of histamine sensitive adenylyl cyclase from guinea-pig mucosa.
Europ. J. Clin. Invest. 6, 113-120 (1976)

PETERSEN, H., MYREN, J.:
Pentagastrin dose - response in peptic ulcer disease.
Scand. J. Gastroent. 10, 705 (1975)

PÜCH, G. H., JUAN, H., KUKOVETZ, W. R.:
Der Einfluß von herz- und gefäßwirksamen Substanzen auf die Aktivität der Phosphodiesterase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 264, 293 (1969)

RAY, T. K., TOMASI, V., MARINETTI, G. V.:
Hormone action at the membrane level. I. Properties of adenyl cyclase in isolated plasma membranes of rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 211, 20-30 (1970)

REINHARDT, D., SCHMIDT, U., BRODDE, O.-E., SCHOMANN, H. J.:
H_1- and H_2-receptor mediated responses to histamine on contractility and cyclic AMP of atrial and papillary muscles from guinea-pig hearts.
Agents and Actions 7, 1-12 (1977)

RICKETTS, W. E., PALMER, W. L., KIRSNER, J. B.:
Achlorhydria and peptic ulcer: a further study of the role of peptic activity in the pathogenesis and course of peptic ulcer.
Ann. Intern. Med. 30, 24 (1949)

ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W., SUTHERLAND, E. W.:
Adenyl cyclase as an adrenergic receptor.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 139, 703-723 (1967)

ROSEN, O. M., ROSEN, S. M.:
Properties of an adenyl cyclase partially purified from frog erythrocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 131, 449-456 (1969)

RUOFF, H.-J.:
Rat gastric mucosal cAMP and cGMP after adrenergic stimulation and blockade.
Europ. J. Pharmacol. 44, 349-354 (1977)

RUOFF, H.-J.:
Adenylate cyclase and specificity of the histamine H_2-receptor in the gastric mucosa of the guinea-pig.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, R 26 (1978)

RUOFF, H.-J., SEWING, K.-Fr.:
Adenylate cyclase and phosphodiesterase in the rat gastric mucosa after starvation, feeding and pentagastrin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 147-153 (1975)

RUOFF, H.-J., SEWING, K.-Fr.:
Adenylate cyclase of the dog gastric mucosa: Stimulation by histamine and inhibition by metiamide.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294, 207-208 (1976)

RUOFF, H.-J., SEWING, K.-Fr.:
Cyclic nucleotides and gastric secretion.
in: Cyclic 3', 5'-nucleotides: mechanisms of action, eds: CRAMER, H., SCHULTZ, J., London, 147-159 (1977)

RUOFF, H.-J., MALCHOW, H., SEWING, K.-Fr.:
Adenylate cyclase in human biopsies from oxyntic and pyloric gland area and duodenal mucosa.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, R 14 (1977)

RUOFF, H.-J., BECKER, M., PAINZ, B., RACK, M., SEWING, K.-Fr., MALCHOW, H.:
Human gastric mucosal adenylate cyclase: Activation by histamine-H_2-receptor stimulation and inhibition by cimetidine in vitro and in peptic ulcer patients.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 15, 147-151 (1979 a)

RUOFF, H.-J., PAINZ, B., BECKER, M., RACK, M., SEWING, K.-Fr., MALCHOW, H.:
Adenylate cyclase in human gastric mucosa: its activation by histamine in morphologically different biopsy specimens.
Klin. Wochenschr. 57, 725-730 (1979 b)

SCHAFER, D. E., EBERSOLE, E. R., DONALDSON Jr., R. M.:
Is guanosine triphosphate involved in the activation of adenylate cyclase by histamine or cholera enterotoxin in gastric mucosa?
Gastroenterology 74, 1090 (1978)

SCHILD, H. O.:
pA, a new scale for the measurement of drug antagonism.
Brit. J. Pharmacol. 2, 189-206 (1947)

SCHMIDT, H. A., HAAKE, U., RIECKEN, E. O.:
Untersuchungen zur Beziehung zwischen Säuresekretion und Belegzellzahl in Biopsiematerial.
Klin. Wochenschr. 50, 744-750 (1972)

SEWING, K.-Fr., HAGIE, L., IPPOLITI, A. F., ISENBERG, J. I., SAMLOFF, I. M., STURDEVANT, R. A. L.:
Effect of one-month treatment with cimetidine on gastric secretion and serum gastrin and pepsinogen levels.
Gastroenterology 74, 376-379 (1978)

SIMON, B., KATHER, H.:
Histamine-sensitive adenylate cyclase of human gastric mucosa.
Gastroenterology 73, 429-431 (1977)

SIMON, B., KATHER, H.:
Adenylate cyclase of human gastric mucosa. Stimulation by prostaglandins.
Res. Exp. Med. 173, 113-117 (1978)

SIMON, B., KATHER, H.:
Hemmung der pentagastrin-stimulierten Magensekretion durch Ranitidin.
Dtsch. med. Wschr. 104, 1676-1678 (1979)

SOLL, A. H., WOLLIN, A.:
The effects of histamine (H), prostaglandin E_2 (PGE_2), and secretin (S) on cyclic AMP in separated canine fundic mucosal cells.
Gastroenterology 72, A-143/1166 (1977)

SONNENBERG, A., HUNZIKER, W., KOELZ, H. R., FISCHER, J. A., BLUM, A. L.:
Stimulation of endogenous cyclic AMP (cAMP) in isolated gastric cells by histamine and prostaglandin.
Acta Physiol. Scand., Special Suppl., 307-317 (1978)

STADELMANN, O., ELSTER, K., STOLTE, M., MIEDERER, S. E., DEYHLE, P., DEMLING, L., SIEGENTHALER, W.:
The peptic ulcer of the stomach -histotopographic and functional investigation.
Scand. J. Gastroent. 6, 613 (1971)

SUN, D. C. H., ROTH, J. L. A.:
Tests employed in analysis of the stomach contents and their clinical application.
in: Gastroenterol. Band I,
eds: BOCKUS, H. L., Philadelphia^3 (1974)

SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W.:
The relation of adenosine 3', 5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev. 12, 265 (1960)

SUTHERLAND, E. W., RALL, T. W., MENON, T.:
Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties.
J. Biol. Chem. 237, 1220-1227 (1962)

SUTHERLAND, E. W., ØYE, J., BUTCHER, R. W.:
The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action.
Recent Progr. Hormone Res. 21, 623-642 (1965)

THOMPSON, W. J., JACOBSON, E. D.:
Comparison of the effects of secretory stimulants and inhibitors on gastric mucosal adenyl cyclases of various species.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 377-381 (1977)

VAUGHAN, M., MURAD, F.:
Adenyl cyclase activity in particles from fat cells.
Biochemistry 8, 3092-3099 (1969)

WALAAS, E., WALAAS, O.:
The effect of epinephrine and dibutyryl 3', 5'-cyclic AMP on the incorporation of ^{32}P inorganic phosphate into adenine nucleotides and guanine nucleotides of the intact isolated rat diaphragm.
Acta. Physiol. Scand. 78, 393-403 (1970)

WAY, L., DURBIN, R. P.:
Inhibition of gastric acid secretion in vitro by prostaglandin E_1.
Nature 221, 874-875 (1969)

WIKSTRØM, B. E., Ågren, G. K.:
Some properties of adenyl cyclase from Ehrlich tumor cells.
Cancer Research 33, 2714-2720 (1973)

WOLLIN, A., CODE, C. F., DOUSA, T. P.:
Interaction of prostaglandins and histamine with enzymes of cyclic AMP metabolism from guinea pig gastric mucosa.
J. Clin. Invest. 57, 1548-1553 (1976)

WORMSLEY, K. G.:
The pathophysiology of duodenal ulceration.
Gut 15, 59-81 (1974)

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Ruoff danke ich für die intensive Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Experimente.

Herrn Prof. Dr. med. K.-Fr. Sewing danke ich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit und seine wertvollen Anregungen.

Über Teile der vorliegenden Ergebnisse wurde auf folgenden Tagungen berichtet:

a) 20. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft vom 20. - 23. März 1979 in Mainz;

b) 80th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association vom 19. - 25. Mai 1979 in New Orleans, Lousiana;

c) Ranitidin-Symposium am 14. Dezember 1979 in Frankfurt/Main.

LEBENSLAUF

Am 11. Oktober 1950 wurde ich, Ulrich Gladziwa, als erster Sohn von drei Kindern des Polizeihauptmeisters Fritz Gladziwa und seiner Ehefrau Barbara, geb. Klinke, in Bielefeld geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Bonifatiusschule in Bielefeld und wechselte dann zum Ratsgymnasium über, wo ich ab Untertertia den altsprachlichen Zweig besuchte.

Nach dem Abitur im Juni 1969 war ich als Apothekerpraktikant in der Engel-Apotheke in Bielefeld tätig und bestand am 23. Juni 1971 die Pharmazeutische Vorprüfung in Detmold. Es folgte das Studium der Chemie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig und — nach der Grundausbildung bei der Bundeswehr — im Wintersemester 1972/73 das Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin. Am 10. April 1974 bestand ich den Ersten Abschnitt und am 29. September 1975 den Zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung. Meine Approbation als Apotheker erhielt ich am 6. November 1975.

Seit Oktober 1975 studierte ich zusätzlich Medizin an der FU Berlin und bestand am 25. März 1977 die Ärztliche Vorprüfung und im selben Jahr am 26. August den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Berlin. Im Sommersemester 1978 setzte ich mein Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen fort und legte am 21. August 1979 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Reutlingen ab. Das Praktische Jahr absolvierte ich anschließend als Student der Gesamthochschule Essen an den Städtischen Kliniken Duisburg mit dem Wahlfach Anästhesie. Mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 8. Oktober 1980 in Duisburg beendete ich mein Studium.